



**Univerzitet u Novom Sadu  
Prirodno-matematički fakultet  
Departman za hemiju, biohemiju  
i zaštitu životne sredine**



**mr Ivana Beara**

**FITOHEMIJSKI SKRINING I PROCENA ANTIOKSIDANTNOG  
I ANTIINFLAMATORNOG POTENCIJALA SEKUNDARNIH  
BIOMOLEKULA U VRSTAMA RODA *PLANTAGO* L.**

**-doktorska disertacija-**

**Novi Sad, 2010.**

*Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u laboratoriji za biohemiju lekovitog bilja na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, u okviru realizacije Projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije br. 142036.*

*Želela bih najiskrenije da se zahvalim svom mentoru prof. dr Nedi Mimici-Dukić za prave savete, priliku koju mi je pružila, iskrenu podršku i poverenje koje mi je ukazala tokom zajedničkog rada. Zahvaljujem se i prof. dr Kseniji Kuhajda za podršku, prof. dr Miri Popović za korisne sugestije, prof. dr Ružici Igić i prof. dr Momiru Mikovu na interesovanju za rezultate prikazanih istraživanja. Za izbor, sakupljanje i determinaciju biljnog materijala veliku zahvalnost dugujem dr Goranu Anačkovu i dr Biljani Božin. Hvala dr Biljani Peković sa Instituta za transfuziju krvi Vojvodine na ustupljenim preparatima trombocita. Dr Teodori Janković, dr Katarini Šavikin i Gordani Zdunić sa Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ zahvaljujem se na prijatnoj saradnji. Najsrdačnije bih se zahvalila Mariji Lesjak na nesebičnoj pomoći i njenom beskrajnom optimizmu i iskrenosti, a Kristini Balog, Emiliji Jovin i Dejanu Orčiću na svemu što su me naučili i pomoći koju su mi pružili. Hvala Ružici Marušić, Jovani Francuz i mr Nataši Simin na iskrenoj, prijateljskoj podršci.*

*Mojoj porodici beskrajno hvala na ljubavi i strpljenju.*

*Novi Sad, april 2010.*

*Ivana Beara*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OPŠTI DEO.....</b>	<b>5</b>
2.1. Rod <i>Plantago</i> L. (Plantaginaceae) .....	5
2.1.1. Taksonomska struktura porodice Plantaginaceae .....	5
2.1.2. Biološke karakteristike vrsta roda <i>Plantago</i> L.....	7
2.1.3. Fitohemijski sastav i biohemijska aktivnost vrsta roda <i>Plantago</i> L. ....	13
2.1.3.1. Fenolna jedinjenja u vrstama roda <i>Plantago</i> L. ....	15
2.1.3.2. Vrste roda <i>Plantago</i> L. kao antioksidantni agensi .....	18
2.1.3.3. Vrste roda <i>Plantago</i> L. kao antiinflamatorni agensi .....	20
2.2. Slobodni radikali i antioksidantni potencijal .....	25
2.2.1. Slobodni radikali i oksidativni procesi.....	25
2.2.2. <i>In vitro</i> metode za određivanje antioksidantnog potencijala.....	27
2.3. Metabolizam arahidonske kiseline .....	33
2.3.1. Arahidonska kiselina i eikozanoidi .....	33
2.3.2. Ciklooksigenazni put metabolizma arahidonske kiseline .....	38
2.3.2.1. COX-1 put metabolizma arahidonske kiseline .....	40
2.3.2.2. Fiziološka dejstva ciklooksigenaznih produkata.....	46
2.3.2.3. Inhibitori ciklooksigenaze .....	48
2.3.3. Lipooksigenazni putevi metabolizma arahidonske kiseline.....	53
2.3.3.1. 5-Lipooksigenazni put metabolizma arahidonske kiseline .....	54
2.3.3.2. 12-Lipooksigenazni put metabolizma arahidonske kiseline .....	58
2.3.3.3. 15-Lipooksigenazni put metabolizma arahidonske kiseline .....	60
2.3.3.4. Fiziološka dejstva lipooksigenaznih produkata .....	61
2.3.3.5. Inhibitori lipooksigenaza.....	63
2.4. <i>In vitro</i> metode za određivanje antiinflamatornog potencijala .....	67
2.4.1. <i>In vitro</i> testovi za određivanje ciklooksigenazne aktivnosti .....	67
2.4.2. <i>In vitro</i> testovi za određivanje 12-lipooksigenazne aktivnosti.....	69
<b>3. EKSPERIMENTALNI DEO .....</b>	<b>72</b>
3.1. Priprema biljnih ekstrakata .....	73
3.2. LC-MS/MS analiza .....	76
3.2.1. HPLC-MS analiza ispitivanih ekstrakata .....	76
3.2.2. Kvantitativno određivanje sadržaja aukubina .....	76
3.2.3. Kvantitativno određivanje sadržaja odabranih flavonoida.....	77
3.3. Određivanje antioksidantnog potencijala .....	78
3.3.1. Određivanje neutralizacije DPPH <sup>•</sup> radikala .....	78
3.3.2. Određivanje kapaciteta „hvatanja“ HO <sup>•</sup> radikala .....	80
3.3.3. Određivanje kapaciteta „hvatanja“ O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> radikala.....	83
3.3.4. Određivanje kapaciteta „hvatanja“ NO <sup>•</sup> radikala .....	85

3.3.5. Određivanje inhibicije lipidne peroksidacije .....	87
3.3.6. Određivanje redukcionog potencijala (FRAP test) .....	90
3.3.7. Određivanje sadržaja ukupnih fenola.....	92
3.3.8. Određivanje sadržaja flavonoida.....	93
3.4. Određivanje antiinflamatornog potencijala.....	95
3.4.1. Određivanje broja trombocita .....	95
3.4.2. Eksperimentalni postupak za određivanje antiinflamatorne aktivnosti .....	96
<b>4. REZULTATI I DISKUSIJA .....</b>	<b>100</b>
4.1. Fitohemijski skrining .....	100
4.2. Antioksidantna aktivnost .....	111
4.3. Antiinflamatorna aktivnost .....	121
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>144</b>
<b>6. SUMMARY.....</b>	<b>150</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>152</b>
<b>8. PRILOG.....</b>	<b>175</b>
8.1. LC-MS/MS analiza .....	175
8.1.1. HPLC-MS hromatogrami ispitivanih ekstrakata - Scan mod .....	175
8.1.2. Kvantitativni sadržaj aukubina .....	179
8.1.3. Kvantitativni sadržaj odabranih flavonoida .....	180
8.2. Antioksidantni potencijal .....	190
8.2.1. Neutralizacija DPPH <sup>•</sup> radikala .....	190
8.2.2. Kapacitet „hvatanja“ HO <sup>•</sup> radikala .....	198
8.2.3. Kapacitet „hvatanja“ O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> radikala .....	206
8.2.4. Kapacitet „hvatanja“ NO <sup>•</sup> radikala .....	213
8.2.5. Inhibicija lipidne peroksidacije.....	220
8.2.6. Redukcioni potencijal (FRAP test) .....	228
8.2.7. Sadržaj ukupnih fenola .....	230
8.2.8. Sadržaj flavonoida .....	232
8.3. Antiinflamatorni potencijal .....	234
<b>9. SKRAĆENICE .....</b>	<b>244</b>

## 1. UVOD

Porodica *Plantaginaceae* Juss., red Lamiales, ima preko 260 vrsta zeljastih, većinom višegodišnjih biljaka. Po Rahn-ovoj klasifikaciji (1996), rod *Plantago* L. se deli na šest podrodova: *Plantago* (sadrži 131 vrstu), *Coronopus* (Lam. & DC.) Rahn (sadrži 11 vrsta), *Albicans* Rahn (51 vrsta), *Psyllium* Juss. (sensu Pilger, 1937; 16 vrsta), *Littorella* (Bergius) Rahn (3 vrste) i *Bouggueria* (Decne.) Rahn (1 vrsta). U tradicionalnoj medicini evropskih naroda izuzetno su cenjene vrste *P. lanceolata*, *P. major* i *P. media*, dok je u azijskoj narodnoj medicini najzastupljenija *P. asiatica* L. Sok iz sveže *P. lanceolata* (Sarić, 1989) se u narodu upotrebljava spolja za lečenje rana i kao sredstvo protiv zapaljenja (antibakterijsko dejstvo). U oficijelnoj medicini, upotreba ove vrste je takođe odobrena, te se *P. lanceolata* koristi u obliku čaja za ublažavanje nadražaja kod katara gornjih delova organa za disanje, a macerat, tečni ekstrakt, sirup, sok sveže biljke ili pastile, koriste se pri lečenju zapaljenja usta i grla (Wichtl, 1994). Lišće *P. major* jedno je od najpopularnijih narodnih medikamenata za lečenje rana, ujeda od insekata, ali i kašlja, bolesti organa za varenje (proliv, katar, grčevi, čir na dvanaestopalačnom crevu i želudcu) ili urinarnog trakta (Tucakov, 1997; Sarić, 1989). Tradicionalna upotreba *P. media* vrlo je slična upotrebi *P. major* (Sarić, 1989). Seme vrsta *P. afra* L. (*P. psyllium* L.), *P. indica* L. (tradicionalno u Evropi; Sarić, 1989), *P. ovata* Forsk. (tradicionalno u Egiptu i Indiji; Jasrai i sar., 1993) i *P. asiatica* L. koriste se u lečenju konstipacije i dijareje (Wichtl, 1994; WHO, 1999). Pored fitofarmaceutske primene, *P. asiatica*, *P. coronopus* i *P. major* koriste se i u ishrani, najčešće kao sveže pripremljena salata (Jančić, 2002; Heimler i sar., 2007; Chon i sar., 2008). Takođe, ispitivanja nekih vrsta roda *Plantago* L. pokazala su da njihovi ekstrakti ili izolovane komponente pokazuju značajnu aktivnost pri lečenju rana, ali da deluju i kao antimikrobni, antiinflamatorni, antiasmatični, antitusični, antispazmatični, imunomodulirajući i antileukemijski agensi (De Castagno, 1970; Debrauwer i sar., 1989; Ravn i sar., 1990; Rombi, 1992; Tosun, 1995; Chang, 1997; Marchesan i sar., 1998; Michaelsen i sar., 2000; Samuelsen, 2000; Westerhof i sar., 2001; Chiang i sar., 2003a; Chiang i sar., 2003b; Gálvez i sar., 2003; Krasnov i sar., 2003; Park i Chang, 2004; Velasco-Lezama i sar., 2006; Fleer i Verspohl, 2007). Široki spektar biološke aktivnosti bokvica posledica je prisustva niza različitih hemijskih konstituenata, kao što su *alkaloidi* (Peyroux i sar., 1972), *derivati kafene kiseline* (Maksyutina, 1971a; Andary i sar., 1988; Murai i sar., 1995; Franzyk i sar., 1998; Rønsted i sar., 2000; Egorov i sar., 2004),

*kumarini* (Haznagy, 1970), *masti i ulja* (Tosun, 1995), *flavonoidi* (Maksyutina, 1971b; Haznagy i sar., 1976; Lebedev-Kosov i sar., 1978; Kawashty i sar., 1994; Nishibe i sar., 1995; Gálvez i sar., 2003; Jurišić-Grubešić i Vladimir-Knežević, 2004; Gálvez i sar., 2005a; Gálvez i sar., 2005b; Pourmorad i sar., 2006; Heimler i sar., 2007; Murai i sar., 2008), *iridoidi* (Andrzejewska-Golec i sar., 1993; Andrzejewska-Golec, 1997; Handjieva i Saadi, 1991; Long i sar., 1995; Taskova i sar., 1999; Rønsted i sar., 2000; Taskova i sar., 2002; Rønsted i sar., 2003; Jurišić-Grubešić i Vladimir-Knežević, 2004; Gálvez i sar., 2005a; Gálvez i sar., 2005b), *sluzi* (Bräutigam i Franz, 1985; Kanbi i Chakraborty, 1990), *polisaharidi* (Samuelsen i sar., 1995; Samuelsen i sar., 1999; Kardošová i Machová, 2006), *masne kiseline* (Ahmed i sar., 1968; Pailer i Haschke-Hofmeister, 1969; Swiatek i sar., 1980; Guil i sar., 1996; Ringbom i sar., 2001), *terpenoidi* (Ringbom i sar., 1998), *steroli* (Afifi i sar., 2001) i *isparljive komponente* (Kameoka i sar., 1979; Fons i sar., 1998).

Pregledom literaturnih navoda (*Poglavlje 2.*) može se zaključiti da iako dosadašnja fitohemijska i biohemijska ispitivanja pojedinih bokvica ukazuju na visok potencijal ovih vrsta kao izvora biološki aktivnih jedinjenja i potentnih lekovitih agenasa, većina predstavnika roda *Plantago* nije okarakterisana u smislu biološke aktivnosti i sastava. Zbog toga su ispitivanja jedanaest vrsta bokvica (*P. altissima* L., *P. argentea* Chaix, *P. bellardii* All., *P. coronopus* L., *P. holosteam* Scop., *P. lanceolata* L., *P. major* L., *P. maritima* L., *P. media* L., *P. reniformis* Beck. i *P. schwarzenbergiana* Schur.) prikazanih u ovom radu obuhvatala dva osnovna pravca:

- *fitohemijski skrining* u cilju određivanja sadržaja odabranih sekundarnih biomolekula i
- *biohemijska ispitivanja* antioksidantnog i antiinflamatornog potencijala metanolnih ekstrakata navedenih vrsta.

Cilj fitohemijskih ispitivanja bila je kvantifikacija značajnog hemotaksonomskog markera aukubina, iridoida čije je prisustvo karakteristično za vrste roda *Plantago* (Andrzejewska-Golec i sar., 1993; Andrzejewska-Golec, 1997; Handjieva i Saadi, 1991; Long i sar., 1995; Taskova i sar., 1999; Rønsted i sar., 2000; Taskova i sar., 2002; Gálvez i sar., 2005a; Gálvez i sar., 2005b) i šest flavonoida: apigenin-7-*O*-glukozida, luteolin-7-*O*-glukozida, rutina, kao i odgovarajućih aglikona apigenina, luteolina i kvercetina. Flavonoidi, klasa prirodnih polifenolnih jedinjenja, imaju važnu ulogu u fiziologiji biljaka.

Poznato je i da su flavonoidi snažni antioksidansi, imuni modulatori, neurostimulatori, analgetici, antiinflamatorni, antialergijski, antiasmatski, antiviralni, antibakterijski, antifungalni i antikancerogeni agensi. Takođe, flavonoidi se koriste kako u prevenciji, tako i u lečenju bolesti kardiovaskularnog sistema, gastrointestinalnog trakta, hiperholesterolemije i arteroskleroze, dijabetesa, za zaceljivanje rana i regeneraciju tkiva, pa čak i u lečenju steriliteta (Slezak i sar., 1995; Giugliano i sar., 1996; Havsteen, 2002; Harrison i sar., 2003; Halliwell, 2007). Poznajući kvalitativni i kvantitativni sastav flavonoidnih komponenti, moguće je pretpostaviti koji tip biološke aktivnosti bi mogao ispoljavati određeni biljni ekstrakt, što može biti smernica za dalje *in vitro* i *in vivo* testove. Kao metoda za kvantifikaciju navedenih jedinjenja odabrana je visoko selektivna i specifična LC-MS/MS tehnika (tačna hromatografija sa tandemskim masenim detektorom), koja omogućava detekciju vrlo niskih koncentracija ciljanog analita.

Prvi segment biohemijskih ispitivanja obuhvatao je određivanje antioksidantnog potencijala metanolnih ekstrakata vrsta roda *Plantago*. Poznato je da su reaktivne vrste kiseonika i azota endogeni intermedijeri koji neprekidno nastaju u živim ćelijama i imaju esencijalnu ulogu u regulaciji niza fizioloških procesa, tako što učestvuju u signalizaciji ćelijskih funkcija (proliferacija, inflamacija i adhezija), zatim u fagocitozi, regulaciji ćelijskog rasta, sintezi biološki važnih jedinjenja i sl. Međutim, niz faktora, kao što su iradijacija, zagađenje vazduha, pušenje i sl. utiču na povećanje nivoa slobodnoradikalnih vrsta, koje zatim mogu da reaguju sa primarnim biomolekulima i naruše normalnu homeostazu ćelije. Naime, slobodni radikali mogu da se adiraju na drugi molekul i izazovu njegovo oštećenje (npr. adicija  $\text{HO}^\bullet$  na DNK), mogu da abstrahuju proton (npr. iz nezasićene masne kiseline u membrani, izazivajući lipidnu peroksidaciju), mogu da budu redukujući (doniranje jednog elektrona) ili oksidativni (abstrakcija jednog elektrona) agensi, pri čemu nastaju nove radikalske vrste i zapravo započinje lančana reakcija (Halliwell i Gutteridge, 2006). U pogledu ispitivanja hrane, neophodno je odrediti efikasnost prirodnih antioksidanata pri zaštiti od oksidativnog oštećenja hrane, kao i antioksidantni kapacitet različitih biljaka, sa ciljem da se ishrana obogati vrstama koje su potentni „hvatači“ slobodnih radikala. Određivanjem antioksidantnog statusa u biološkim sistemima može se pratiti uticaj ishrane na oksidativni stres i doprinos u prevenciji bolesti čiji uzročnici su oksidativna oštećenja (Sánchez-Moreno, 2002). Za određivanje antioksidantne aktivnosti ispitivanih ekstrakata odabrane su validne, literaturno poznate, spektrofotometrijske metode. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida, potentnih prirodnih

antioksidantnih agenasa, određen je u cilju ispitivanja stepena korelacije između sadržaja ovih jedinjenja i antioksidantne aktivnosti.

Drugi segment biohemijske karakterizacije metanolnih ekstrakata vrsta roda *Plantago* obuhvatao je *in vitro* ispitivanje antiinflamatornog potencijala, odnosno potencijala inhibicije ciklooksigenaze-1 (COX-1) i 12-lipooksigenaze (12-LOX), enzima uključenih u metabolizam arahidonske kiseline. Eikozanoidi, proizvodi ciklooksigenaznog i lipooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline, obuhvataju četiri klase jedinjenja: prostaglandine (PG), tromboksane (TX), leukotriene (LT) i lipoksine (LX). Oni su farmakološki i fiziološki medijatori uključeni u brojne fiziološke procese i predstavljaju jedne od najvažnijih medijatora zapaljenskih reakcija i drugih patoloških procesa u ljudskom organizmu. Iako se smatra da je COX-1 konstitutivni enzim, budući da učestvuje u normalnoj homeostazi ćelije, literaturni navodi ukazuju na povećanu ekspresiju COX-1 u ćelijama epitelnog kancera ovarijuma (Daikoku i sar., 2005), dojki (Hong i sar., 1999; McFadden i sar., 2006), kolona, pluća i prostate (Hong i sar., 1999), a da selektivni inhibitori ovog enzima mogu uticati na smanjenje rasta i proliferacije, kao i na apoptozu ćelija tumora (Daikoku i sar., 2005). Takođe, smatra se da 12-LOX utiče na proliferaciji tumorskih ćelija, kao i na njihov rast, jer je utvrđena znatno veća koncentracija 12-LOX u malignim nego u benignim ćelijama tumora prostate, pankreasa, dojki i pluća (Nie i Horn, 2002). *In vivo* eksperimenti na životinjama zahtevaju odgovarajuće dozvole i u mnogim zemljama su zabranjene, pa su stoga ova ispitivanja bila usmerena ka razvijanju *in vitro* metode koja će pružiti mogućnost efikasnog određivanja COX-1 i 12-LOX inhibitorne aktivnosti kako biljnih ekstrakata, tako i izolovanih prirodnih proizvoda. Razvijanje ove metode podrazumevalo je, pored odabira izvora COX-1 i 12-LOX enzima, načina indukcije inflamacije i načina detekcije metabolita, takođe i detaljnu optimizaciju eksperimentalnog postupka. Iako je literaturno poznato nekoliko *in vitro* metoda za praćenje COX-1 i 12-LOX aktivnosti (Safayhi i sar., 1992; Nakatsuka i Osawa, 1994; Schneider i sar., 2004) zasnovanih na primeni humanih trombocita kao intaktnog ćelijskog sistema koji sadrži oba enzima, u njima se znatno razlikuju načini indukcije inflamacije i kvantifikacije nastalih metabolita, čija koncentracija predstavlja stepen aktivnosti COX-1 i 12-LOX. Zbog toga je optimizacija metode podrazumevala utvrđivanje odgovarajućeg odnosa broja trombocita i koncentracije aktivirajućih jedinjenja u cilju dobijanja detektibilne količine 12-HHT i 12-HETE metabolita, zatim optimizaciju faze njihovog izolovanja (ekstrakcije) i naposljetku određivanje parametara LC-MS/MS metode, odabrane za njihovu kvantifikaciju.

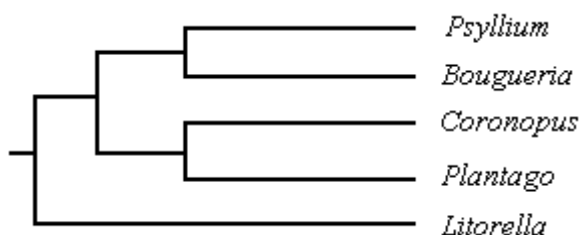


## 2. OPŠTI DEO

### 2.1. Rod *Plantago* L. (*Plantaginaceae*)

#### 2.1.1. Taksonomska struktura porodice *Plantaginaceae*

Porodica *Plantaginaceae* Juss., red *Lamiales*, ima preko 260 vrsta zeljastih, većinom višegodišnjih biljaka. Infragenerička klasifikacija vrsta roda *Plantago* (bokvica) se menjala vremenom. Prvi je Decaisne (1852) svrstao oko 200 vrsta u sedamnaest sekcija, a zatim je Piliger (1937) izvršio reviziju, uključivši oko 260 vrsta i svrstavajući neke od Decaisne-ovih vrsta u druge rodove. Piliger-ova klasifikacija podrazumeva dva podroda: *Psyllium*, uključujući srodne vrste, i *Plantago*, sa osamnaest sekcija vrlo sličnih Decaisne-ovim. Po prvoj Rahn-ovoj podeli (1978) postoje tri podroda: *Plantago* i *Coronopus* (Lam. & DC.) Rahn, koji obuhvata mediteranske vrste ranije svrstavane u podrod *Plantago* Sect. *Coronopus* sensu Piliger i *Psyllium* Rahn, koji uključuje Pilgerov podrod *Psyllium* i 5 sekcija podroda *Plantago* (*Oreades*, *Arnoglossum*, *Bauphula*, *Hymenopsyllium* i *Leucopsyllium*). Međutim, po poslednjoj Rahn-ovoj klasifikaciji (1996), rod *Plantago* se deli na šest podrodova: *Plantago* (sadrži 131 vrstu), *Coronopus* (Lam. & DC.) Rahn (sadrži 11 vrsta), *Albicans* Rahn (51 vrsta), *Psyllium* Juss. (sensu Pilger, 1937; 16 vrsta), *Littorella* (Bergius) Rahn (3 vrste) i *Bougueria* (Decne.) Rahn (1 vrsta). Rønsted i saradnici (2002) molekularnom filogenetskom studijom identifikuju pet većih monofiletičkih klada, analognih podrodovima *Plantago*, *Coronopus*, *Bougueria*, *Psyllium* i *Littorella*. Podrod *Albicans* sensu Rahn (1996) je parafiletski i podvodi se unutar podroda *Psyllium*, dok je *Littorella* sestrinska grupa svim podrodovima (Slika 2.1.).



Slika 2.1. Filogenetski odnosi između podrodova roda *Plantago*

Proučavanje flavonoida kao taksonomskih markera pokazalo je da rod *Plantago* uglavnom sadrži flavone (Harborne i Williams, 1971; Kawashty i sar., 1994; Nishibe i sar., 1995). U redu *Lamiales*, flavoni preovlađuju u odnosu na flavonole, što je takođe

slučaj kod roda *Plantago*. Iako je ispitan mali broj vrsta, dobijeni rezultati pokazuju da podrod *Plantago* i *Coronopus* sadrže luteolin i 6-hidroksiluteolin, dok je u podrodu *Albicans* prisutan samo luteolin. Kawashty i saradnici (1994) izolovali su flavonol izoramnetin-3-glukozid iz tri vrste podroda *Albicans*. Detaljan pregled flavonoida prisutnih u vrstama roda *Plantago*, koje su ispitivane u ovom radu, dat je u *Poglavlju 2.1.3.1.*

Hemotaksonomski značaj kafeoil feniletanoidnih glukozida je takođe proučavan (Andary i sar., 1988; Noro, 1991; Rønsted i sar., 2000), pri čemu Andary i saradnici (1988) smatraju da ova klasa jedinjenja ima hemotaksonomski značaj, ali samo unutar roda. U nizu feniletanoida izolovanih iz vrsta roda *Plantago* (*Poglavlje 2.1.3.1.*), verbaskozid (akteozid) i plantamajozid su najčešće prisutni.

Za treću grupu sekundarnih metabolita, iridoidne glukozide (iridoide) utvrđeno je da su validni hemotaksonomski markeri podroda i sekcija roda *Plantago* (Rønsted i sar., 2003). Naime, raniji radovi (Andrzejewska-Golec i sar., 1993; Andrzejewska-Golec, 1997) pokazuju da prisustvo određenih iridoida može biti specifično unutar podroda, a samim tim i podržavati odgovarajuću poddelu. Tako je na primer, utvrđeno da su bartziozid i plantarenalozid karakteristični za vrste podroda *Psyllium* (Andrzejewska-Golec i sar., 1993; Andrzejewska-Golec, 1997), a da je katalpol prisutan u Pilgerov-im sekcijama *Oreades*, *Bauphula*, *Arnoglossum* i *Leucopsyllium*, svrstanih u podrod *Albicans* sensu Rahn, 1996. Rønsted i saradnici (2000) potvrđuju dobru korelaciju između iridoidnog sastava i klasifikacije po Rahn-u: aukubin je iridoid prisutan u gotovo svim vrstama roda *Plantago*, bartziozid i plantarenalozid su skoro potpuno specifični za podrod *Psyllium*, katalpol je karakterističan za podrod *Albicans* i praćen je asperulozidom u tri od ukupno šest Rahn-ovih sekcija. Takođe, podržana je podela podroda *Coronopus* na sekcije *Coronopus* i *Maritima*. Iako se prvo smatralo da vrste koje pripadaju sekciji *Coronopus* (podrod *Coronopus*) ne sadrže iridoide, kasnije je utvrđeno da oni nisu prisutni samo kod *P. coronopus* L., *P. subspathulata* Pilg. i *P. macrorhiza* Poir., dok predstavnici sekcije *Maritima* sadrže mnoštvo iridoida, naročito melitozidnog tipa. U pogledu sadržaja iridoida i evolucionih pravaca roda *Plantago*, Taskova i saradnici (2002) vrše poddelu na četiri grupe: vrste kod kojih je biosinteza iridoida limitirana na ranu fazu i one sadrže uglavnom aukubin (npr. *P. major*, *P. cornuti* i *P. gentianoides*), vrste u kojima je aukubin prekursor različitim derivatima, kao što je monomelitozid (npr. *P. subulata*, *P. media*), vrste u kojima se sintetišu aukubin i katalpol (npr. *P. lanceolata*, *P. altissima*, *P. argentea* i *P. lagopus* iz sekcije *Arnoglossum* Decne. (*Lanceifolia* Rahn) i *P. atrata* iz sekcije *Oreades*

Decne.) i vrste koje sadrže aukubin i plantarenalozid (npr. *P. afra* i *P. scabra* iz podroda *Psyllium*).

### 2.1.2. Biološke karakteristike vrsta roda *Plantago* L.

U pogledu morfoloških karakteristika, jednogodišnje ili višegodišnje zeljaste, polužbunaste ili žbunaste biljke roda *Plantago* imaju jednostavne listove najčešće sakupljene u vrlo izrazitu prizemnu rozetu, a ređe rastavljene na stabljici, naizmenično ili naspramno raspoređene. Cvetovi su sa braktejama, sakupljeni u klasolike ili ponekad glavičaste cvasti, hermafroditni, pri osnovi sa ljuspastim listićem i braktejom. Čašica ima četiri čašićna listića, obično slobodna, a ponekad se dva prednja čašićna listića razlikuju formom od zadnjih, sušna je i ostaje do sazrevanja ploda. Krunica je pravilna, opnasta, sa cilindričnom cevi i četiri odstojeća režnja savijena u stranu ili na dole. Imaju četiri prašnika, koji su učvršćeni na kruničnoj cevi i alterniraju sa kruničnim režnjevima. Prašničke niti su dugačke i u znatnoj meri štrče iz krunične cevi. Imaju jedan tučak. Plod je čaura, dvooka, ređe tro- i četvorooka, sa jednim ili nekoliko semena u svakom okcu. Nakon sazrevanju semena gornji deo čaure se odvaja po prstenastom poprečnom šavu i otpada, izuzev kod *P. macrocarpa*, kod koje se čaura ne otvara i nema prstenastog šava (Janković i Gajić, 1974).

Na Balkanskom poluostrvu zastupljene su vrste podrodova *Plantago*, *Coronopus* i *Psyllium*. Četrnaest vrsta je prisutno u Republici Srbiji: *P. major* L., *P. reniformis* Beck., *P. media* L., *P. lanceolata* L., *P. altissima* L., *P. atrata* Hoppe, *P. tenuiflora* Waldst. et Kit., *P. coronopus* L., *P. maritima* L., *P. holosteum* Scop., *P. schwarzenbergiana* Schur.,

*P. gentianoides* Sibth. et Smith, *P. argentea* Chaix i *P. indica*

L. U ovom radu, ispitano je jedanaest vrsta u pogledu određenog fitohemijskog sastava i biološke aktivnosti, a njihove morfološke karakteristike će biti ukratko prikazane.

*Plantago altissima* L. (Slika 2.2.), u narodu poznata kao bučak, je višegodišnja zeljasta biljka sa puzećim položenim rizomom i drškama cvasti visokim od 30 do 100 cm. Svi listovi se nalaze u prizemnoj rozeti, izduženo su lancetasti, dugi do 30 cm i široki 2 do 4 cm, sa 3 do 7 nerava, na kratkim drškama. Na obodu su proređeno nazubljeni,



Slika 2.2. *Plantago altissima* L.  
([www.flickr.com/photos/digitplantimages/3581226870/](http://www.flickr.com/photos/digitplantimages/3581226870/))

na vrhu ušiljeni, goli ili sa retkim dlakama. Drške cvasti su okrugle i višestruko užlebljene, retko dlakave. Brakteje su trouglasto jajaste, ušiljene, sa širokom opnastom i sušnom ivicom, svetlo mrke boje, duže od čašice. Cvetovi su sakupljeni u kratke klasove, valjkastog ili jajastog oblika, od 2 do 3 cm dugački. Čašica ima tri pukotine, dva prednja čašična režnja su rebrasto srasla, a oba zadnja su slobodna. Krunica je duga 3 mm, beličasta ili mrka, a krunična cev je gola. Prašnici su dva do tri puta duži od krunice, beličasti, sa žućkasto belim anterama. Čaura je jajasta, od 4 do 5 mm duga, dvooka, sa mnogo semena. *P. altissima* je rasprostranjena u južnim delovima srednje Evrope, Italiji i Balkanskom poluostrvu, a nastanjuje vlažne livade i slatine. (Janković i Gajić, 1974).



Slika 2.3. *Plantago argentea* Chaix

([www.botanik.uni-karlsruhe.de/garten/fotos-hassler/Plantago%20argentea%20BotKA%20F1.jpg](http://www.botanik.uni-karlsruhe.de/garten/fotos-hassler/Plantago%20argentea%20BotKA%20F1.jpg))

*Plantago argentea* Chaix (Slika 2.3.), u narodu poznata kao bučak, je višegodišnja zeljasta biljka sa kratkim rizomom, visoka 10 do 40 cm. Cela biljka je svetlo srebrnasta od gustih, položenih dlaka. Svi listovi se nalaze u formi prizemne rozete, imaju drške, lancetastog su oblika. Listovi imaju 3 do 5 nerava, ušiljeni su i pokriveni gustim, priljubljenim, svilenkastim (srebrnkastim), često sedim dlakama. Cvetovi su

u jajastim ili kratko valjkastim klasovima, za vreme cvetanja loptastim, dužine 1 do 2 cm. Brakteje su jajaste, ušiljene, sušne, po sredini razbacano dlakave. Krunica je gola, svetlo mrka,

sa golom kruničnom cevi. Čaura je jajasta, duga 3 mm, dvooka, sa po jednim semenom u svakom okcu. *P. argentea* nastanjuje sunčana mesta, suve livade i sušna mesta. Rasprostranjena je u južnoj Francuskoj, Italiji, Austriji, Mađarskoj i na Balkanskom poluostrvu. U Srbiji se može naći u istočnim (Pleš) i južnim (Prokletije) delovima (Janković i Gajić, 1974).



Slika 2.4. *Plantago bellardii* All.

([www.sophy.u-3mrs.fr/Photo-cp/Pic/Plantago\\_bellardii\\_27\\_04\\_2003\\_1.JPG](http://www.sophy.u-3mrs.fr/Photo-cp/Pic/Plantago_bellardii_27_04_2003_1.JPG))

*Plantago bellardii* All. (Slika 2.4.) je jednogodišnja zeljasta biljka, čiji se linearno-lanceolaasti listovi dužine 5-7 cm nalaze u formi jedne ili više rozeta. Po obodu, listovi mogu biti potpuno ili delimično nazubljeni, imaju 3 nerva, delimično do gusto pokriveni sa manje ili više izraženim dlakama. Drški cvasti ima 1-7, okrugle su, mestimično pokrivenne kraćim i

dužim dlakama. Cvasti su 1-2 cm dugačke, gusto raspoređene. Brakteje (3-6 mm) su okruglo-

lancetaste, dlakave. Čašićni listići su nejednaki, prednji su 4-5 mm dugački, sa vrlo uskim, braon ivicama, zadnji su 3-4 mm dugački, široki, takođe sa braon ivicama. Krunična cev je dugačka oko 3.5 mm, glatka, a režnjevi (oko 2 mm) su ovatno-lancetasti, zašiljeni. Prašnici su oko 2 mm, čaura oko 2 mm, dva semena (oko 1.75 mm) su usko elipsoidna. *P. bellardii* nastanjuje suva i peskovita mesta. Rasprostranjena je u južnoj Evropi, ali se ne može naći u Srbiji.



Slika 2.5. *Plantago coronopus* L.

([www.static.panoramio.com/photos/original/1673396.jpg](http://www.static.panoramio.com/photos/original/1673396.jpg))

*Plantago coronopus* L. (Slika 2.5.), u narodu poznata kao jelenji rog ili vranina noga, je jednogodišnja do dvogodišnja zeljasta biljka. Stabljika je visoka 5-15 cm sa končastim, vretenastim korenom. Listovi su prizemni, duguljasto lancetasti ili linearni, pokriveni štrčećim kratkim dlakama. Mogu biti nedeljeni, perasto režnjevito usečeni ili retko, dvostruko režnjeviti, a režnjevi mogu biti lancetasti ili

linearni. Cvetnih stabala ima mnogo, pokrivene su gusto prileglim račvastim dlakama koje mogu biti ustajuće ili uspravne, okrugle, kraće ili duže od listova. Klas je gotovo iste dužine kao i cvatna drška, cilindrično linearan, gust, na poprečnom preseku okrugao. Brakteje su zelene, kožasto oivičene, po ivici sa trepljama, jajaste ili jajaso lancetaste, naglo ušiljene, jednake čašici ili duže od nje. Dva prednja listića čašice su dlakava, a dva zadnja listića po leđima imaju kožasta i treplasta krila. Krunica je jedva 2 mm dugačka, krunična cev je pokrivena dlakama, a krunični režnjevi su beličasti, po sredini sa smeđim nervom. Prašnički konci su više od dva puta duži od krunice, beličasti sa žućkastim aterama. Čaura je dugačka 1.5 mm, ima četiri semena, a zatvorena je očvrsлом čašicom. Seme je smeđe, elipsoidno, dugačko 0.7 mm. *P. coronopus* raste na peskovitim (dine), zaslanjenim i stenovitim mestima, kao i na obodima vinograda. Rasprostranjena je u centralnoj i južnoj Evropi, severnoj Africi i jugozapadnoj Aziji. U Srbiji se može naći u okolini Vranja (Janković i Gajić, 1974).

*Plantago holosteum* Scop. (Slika 2.6.), u narodu poznata kao minja moravica, je višegodišnja zeljasta biljka visine 10 do 30 cm, sa snažnim, debelim, vretenstnim i odrvenjenim korenom. Listovi su u prizemnoj rozeti, uzano linearni, jedva 1 mm široki, okruglasto trouglasti u poprečnom preseku, a od dole grebenasti. Ima veći broj uspravnih cvetnih stabljika, a cvetovi su sakupljeni u cilindrične, guste klasove, 2 do 6 cm dugačke. Brakteje su u osnovi jajaste, dok su ka vrhu lancetasto sužene i mogu biti jednake ili duže





Slika 2.6. *Plantago holosteum* Scop.  
([www.y.delfi.lv/norm/32404/712738\\_kD0y6F.jpeg](http://www.y.delfi.lv/norm/32404/712738_kD0y6F.jpeg))

od čašice. Čašični listići su svi jednaki, jajasti, zeleni, sa leđne strane grebenasti, ali bez sušnog oboda. Krunični režnjevci su dugi 3 do 4 mm, a krunična cev je dlakava. Jajasta čaura, duža od čašice, je dvoooka sa elipsoidnim semenom (1.5 mm) u svakom okcu. *P. holosteum* raste na stenovitim i krševitim, sunčanim mestima. Rasprostranjena je na Pirinejskom poluostrvu, u južnoj i zapadnoj Francuskoj, severnoj Italiji, na južnim Alpima, Balkanskom poluostrvu i u maloj Aziji. U Srbiji raste na stenovitim mestima, a vrlo česta je na serpentinu (Janković i Gajić, 1974).



Slika 2.7. *Plantago lanceolata* L.  
([www.s3.amazonaws.com/lcp/myrtus/myfiles/Plantago-lanceolata1.jpg](http://www.s3.amazonaws.com/lcp/myrtus/myfiles/Plantago-lanceolata1.jpg))

*Plantago lanceolata* L. (Slika 2.7.) ili u narodu poznata kao muška ili uskolisna bokvica je višegodišnja zeljasta biljka 5 do 50 cm visoka sa dobro razvijenim kratkim, vertikalnim rizomom i sa nekoliko ili mnogo (do 30) uspravnih cvetnih stabljika (držki). Listovi u prizemnoj rozeti su eliptično-lancetasti, lancetasti ili linearno-lancetasti, sa 3 do 7 nerava, od osnove ka vrhu postepeno suženi, ušiljeni. Nalaze se na

kratkim ili dosta dugačkim drškama, mogu biti celi po obodu ili sa malobrojnim zupcima, gusto dlakavi, vunasti, ili pak goli. Drške cvasti su izrazito uzdužno izbrazdane, obično dlakave, dok su im cvetovi skupljeni u guste, glavičaste ili cilindrične klasove, dugačke 0.5 do 7 cm. Brakteje su jajaste ili eliptične, opnaste (ali sa jasno izraženim zeljastim grebenom, koji ne dostiže vrh brakteje), kratko ili dosta dugačko zaoštrene, dužinom jednake čašici ili je premašuju, gole ili retko dlakave. Čašični listići su 2.5 do 3.5 mm dugački, opnasti (sa izraženim zeljastim grebenom), goli ili ređe dlakavi na leđnoj strani. Krunični režnjevci su jajasti ili izduženo jajasti, zaoštreni, oko 12 mm dugi. Čaure mogu biti eliptičnog ili jajastog oblika oko 3 mm duge i dvosemene, a samo seme je crnkasto, sa jedne strane ispupčeno, a sa druge užlebljeno. *P. lanceolata* je široko rasprostranjena na Balkanskom poluostrvu i na teritoriji Srbije, zatim na teritoriji gotovo čitave Evrope, severne i srednje Azije, Iranu, kao i u Australiji, severnoj Americi, severnoj Africi, Brazilu, Čileu, Cejlonu, Novom Zelandu. Raste na livadama pored puteva, u baštama, po njivama, na peskovitim mestima, po krševima i u planinama na nadmorskim visinama i preko 2000 m (Janković i Gajić, 1974).



Slika 2.8. *Plantago major* L.

([www.wnmu.edu/academic/nspages/2/gilafiora/plantago\\_major.jpg](http://www.wnmu.edu/academic/nspages/2/gilafiora/plantago_major.jpg))

*Plantago major* L. (Slika 2.8.) je u srpskom narodu najpoznatija kao ženska ili širokolista bokvica. Takođe je poznata i kao: vela bokvica, veliki tropec, veliki tripunac, ženski žilovak, žilavac, marina bokva itd. To je višegodišnja ili dvogodišnja zeljasta biljka, visoka 10 do 70 cm, sa jednom ili više uspravnih ili uzlazećih cvatnih stabljika. Listovi su u prizemnoj rozeti, široko jajasti ili eliptični, zatupasti, pri osnovi obično okrugli, po obodu celi ili nazubljeni u donjem delu. Većinom sadrže 3 do 7 nerava, na dugačkim su drškama, goli ili sa retkim kratkim dlakama. Lisne drške su su duže od liske ili iste dužine, a retko kraće od nje. Cvetovi su obično sakupljeni u vrlo dugačke, uzane, cilindrične, 2 do 35 cm duge klasove, koji su najčešće dosta zbijeni i samo u donjem delu isprekidani, sa nekoliko razmaknutih cvetova, koji retko mogu biti razmaknuti čitavom dužinom klasa. Brakteje su trouglasto jajaste, grebenaste, po obodu široko opnaste i obično kraće od čašice. Čašični listići su široko eliptični, sa grebenastim srednjim nervom, zeleni, 1.5 do 2.5 mm dugački, a na vrhu okruglasti, po obodu široko opnasti. Krunični režnjevi su jajasti ili jajasto-lancetasti, oko 1 mm dugi, većinom zatupasti. Prašnici su dva do dva i po puta duži od krunice. Čaura je jajasta, 2-4 mm duga, znatno duža od čašice, većinom sa mnogobrojnim semenima (5 do 35). Seme je tamno i mrko, oko 1 mm dugačko, često uglasto. Ova vrsta raste na livadama, na usevima, oko naselja, na zatravnjenim mestima, pored puteva, na peskovitim i prisojnim mestima, na pržinama. Rasprostranjena je u gotovo čitavoj Evropi, severnoj i srednjoj Aziji, a na drugim kontinentima se gaji kao adventivna biljka (Janković i Gajić, 1974).



Slika 2.9. *Plantago maritima* L.

([www.media.photobucket.com/image/plantago%20maritima/Syl2000/Flora%20-%20Flowers%20S-Y/SeaPlantain-Plantagomaritima.jpg](http://www.media.photobucket.com/image/plantago%20maritima/Syl2000/Flora%20-%20Flowers%20S-Y/SeaPlantain-Plantagomaritima.jpg))

*P. maritima* L. (Slika 2.9.), u narodu poznata kao baučak, je višegodišnja zeljasta biljka visoka 6-40 cm, sa dobro razvijenim korenom i sa nekoliko ili više cvatnih stabljika. Svi listovi su sakupljeni u rozetu, mesnati, linearni, široko linearni ili lancetasto-linearni, širine 2-6 mm. Najčešće su užljebljeni, ravnog oboda ili sa malobrojnim zupcima, goli, a rede dlakavi, sivo-zelene boje. Cvetovi su na cvatnim stabljikama sakupljeni u guste, uzano cilindrične ili glavičaste cvasti duge 0.5-15 cm. Brakteje su

lancetaste jajaste ili široko jajaste, ušiljene ili tupe, obodom opnaste, ponekad oštro grebenaste (kljunaste) kraće ili duže od čašice. Čašični listići su elipsoidni ili jajasto elipsoidni, 2 do 3 mm dugački, sa dobro izraženim grebenom i široko opnastim obodom. Čaura je duga 2 do 4 mm, jajasta ili izdužena, obično sa dva izdužena ili jajasto izdužena semena, oko 2 mm dugačka. *P. maritima* raste na slanim livadama i duž zaslanjenih morskih obala. Rasprostranjena je u Skandinaviji, zapadnoj i srednjoj Evropi, zapadnom i istočnom Sredozemlju, Balkanskom poluostrvu, Sibiru, Maloj Aziji, Iranu, Srednjoj Aziji, Mongoliji, kao i u severnoj i južnoj Americi. U Srbiji se može naći na teritoriji Vojvodine (Janković i Gajić, 1974).



Slika 2.10. *Plantago media* L.  
([www.herba.msu.ru](http://www.herba.msu.ru))

*Plantago media* L. (Slika 2.10.), poznata u narodu kao srednja bokvica, je višegodišnja zeljasta biljka. Visoka je 10 do 50 cm, ima prizemnu lisnu rozetu i nekoliko cvetnih stabljika, koje su pri osnovi ležeće, a zatim uzlazeće. Listovi su joj občno široko eliptični ili jajasti, ređe jajasto-lancetasti, sa 5 do 9 nerava, manje-više dlakavi, obično dva do dva i po puta duži nego širi, obodom celi ili sa retkim zupcima i obično zašiljeni.

Mogu biti sedeći ili pri osnovi suženi u kratku i široku dršku, dok su na krajevima obično zašiljeni. Cvetne stabljike mogu biti manje-više dlakave, imaju zbijene, cilindrične klasove, dugačke 2 do 6 cm. Brakteje su jajaste ili izduženo jajaste, zatupase, obodom opnaste bez grebena, jednake ili skoro jednake čašici. Eliptični ili jajasto eliptični čašični listići su opnasti i imaju izraženi zeljasti greben dugačak 1.5 do 2 mm. Krunični režnjevi su jajasti ili izduženo jajasti, 1.5 do 2 mm dugi. Čaura, koja je jajasta, 2 do 4 mm duga, sadrži 2 do 5 slabo naboranih crnih semena. *P. media* je rasprostranjena po čitavoj Evropi, umereno u Aziji, dok je na Balkanskom poluostrvu i u Srbiji široko rasprostranjena (Janković i Gajić, 1974).

*Plantago reniformis* Beck, u narodu poznata i kao bučak, je višegodišnja biljka sa horizontalnim rizomom dužine do 5 cm. U rozeti se nalaze 4 do 7 listova koji su široko jajasti, skoro okruglasti ili bubrežasti, u osnovi srcasti ili odsečeni, u gornjem delu nepravilno, lučno talasasti ili široko tupo nazubljeni, a u donjem delu često krupno, nepravilno nazubljeni ili pri osnovi režnjevito usečeni. Režnjevi su tupi, sa donje strane po nervima pokriveni dlakama, i imaju dugačke drške. Cvatna drška je dva do tri puta duža od listova, okrugla. Klas je cilindričan, a brakteje gole sa širokim kožastim obodom, skoro jednake čašici. Oblik brakteje je lancetasto cilindrični ili lancetasto-jajasti, fino ušiljen,



dužine do 2.5 mm. Krunična cev je duža od čašice sa režnjevima dugim 1 do 1.25 mm. Prašnički konci su otvoreno ljubičasti, antere bele i 2 mm dugačke. Čaura ima po 2 okca, oba sa po jednim semenom. *P. reniformis* je endemska vrsta, rasprostranjena u Srbiji, Bosni i Hercegovini, Crnoj Gori i Albaniji. U Srbiji se može naći na Kosovu (Koprivnik, kod Peći i na Prokletijama). Naseljava visokoplaninske pašnjake, i posebno vlažna mesta (Janković i Gajić, 1974).



Slika 2.11. *Plantago schwarzenbergiana* Shur.  
([www.nyf.hu/others/html/kornyezettud/mm/kornytud/termved/tgy2/plasch1.jpg](http://www.nyf.hu/others/html/kornyezettud/mm/kornytud/termved/tgy2/plasch1.jpg))

*Plantago schwarzenbergiana* Schur. (Slika 2.11.) je višegodišnja zeljasta biljka sa dugačkim rizomom. Listovi su prizemni, malo mesnati, lancelasti ili eliptično lancelasti, 2-7 cm dugački, 1-2.5 cm široki, po obodu celi ili kratko i razređeno nazubljeni, sa 3 do 5 nerava. Listovi mogu biti sa dugačkim dlakama ili goli. Drške listova su pri osnovi proširene i obrazuju rukavac. Cvatna drška je duga 6 do 25 cm,

gola ili razređeno dlakava, slabo izbrazdana. Klasovi su usko cilindrični, dužine do 9 cm. Brakteje su eliptične i konkavne, 2.5 mm dugačke, sa kobilicom. Prednji listići čašice su dugački 2.25-2.5 mm, konkavni, sa kobilicom, usko eliptični, sa kratkim vrhom, dok su zadnji listići 1.5 mm dugački i nemaju kobilicu. Krunični režnjevi su beli, jajasti, fino ušiljeni. Antere su bele i dugačke 2 mm. Čaura je konusna, sa 4 do 5 semena (1.5 mm). *P. schwarzenbergiana* je endemska vrsta i rasprostranjena je na teritoriji Vojvodine, Mađarske i Rumunije, a nastanjuje zaslanjena i vlažna mesta (Janković i Gajić, 1974).

### 2.1.3. Fitohemijski sastav i biohemijska aktivnost vrsta roda *Plantago* L.

Niz naučnih oblasti, koje obuhvataju fitohemijska ispitivanja, ispitivanja biološke aktivnosti, fiziologije biljaka, ekoloških uticaja i sl., imaju za cilj karakterizaciju vrsta roda *Plantago* (Fons i sar., 2008). Fitohemijska ispitivanja ukazuju na prisustvo različitih hemijskih konstituenata, kao što su *alkaloidi* (Peyroux i sar., 1972), *derivati kafene kiseline* (Maksyutina, 1971a; Andary i sar., 1988; Murai i sar., 1995; Franzyk i sar., 1998; Rønsted i sar., 2000; Egorov i sar., 2004), *kumarini* (Haznag, 1970), *masti i ulja* (Tosun, 1995), *flavonoidi* (Maksyutina, 1971b; Haznag i sar., 1976; Lebedev-Kosov i sar., 1978; Kawashty i sar., 1994; Nishibe i sar., 1995; Gálvez i sar., 2003; Jurišić-Grubešić i

Vladimir-Knežević, 2004; Gálvez i sar., 2005a; Gálvez i sar., 2005b; Pourmorad i sar., 2006; Heimler i sar., 2007; Murai i sar., 2008), *iridoidi* (Andrzejewska-Golec i sar., 1993; Andrzejewska-Golec, 1997; Handjieva i Saadi, 1991; Long i sar., 1995; Taskova i sar., 1999; Rønsted i sar., 2000; Taskova i sar., 2002; Rønsted i sar., 2003; Jurišić-Grubešić i Vladimir-Knežević, 2004; Gálvez i sar., 2005a; Gálvez i sar., 2005b), *sluzi* (Bräutigam i Franz, 1985; Kanbi i Chakraborty, 1990), *polisaharidi* (Samuelsen i sar., 1995; Samuelsen i sar., 1999; Kardošová i Machová, 2006), *masne kiseline* (Ahmed i sar., 1968; Pailer i Haschke-Hofmeister, 1969; Swiatek i sar., 1980; Guil i sar., 1996; Ringbom i sar., 2001), *terpenoidi* (Ringbom i sar., 1998), *steroli* (Afifi i sar., 2001), i *isparljive komponente* (Kameoka i sar., 1979; Fons i sar., 1998). Budući da se aktivnost fenolnih, odnosno flavonoidnih jedinjenja može dovesti u vezu sa na primer antioksidantnim ili antiinflamatornim dejstvom ekstrakata koji ih sadrže, pregled literature o fenolnim jedinjenjima prisutnim u vrstama roda *Plantago* koje su bile predmet naših ispitivanja dat je u *Poglavlju 2.1.3.1.*

Ispitivanja biološke aktivnosti vrsta roda *Plantago* pokazala su da njihovi ekstrakti ili izolovane komponente pokazuju značajnu aktivnost pri lečenju rana, ali da deluju i kao antimikrobni, antiinflamatorni, antiasmatični, antitusični, antispazmatični, imunomodulirajući i antileukemijski agensi (De Castagno, 1970; Debrauwer i sar., 1989; Ravn i sar., 1990; Rombi, 1992; Tosun, 1995; Chang, 1997; Marchesan i sar., 1998; Michaelsen i sar., 2000; Samuelsen, 2000; Westerhof i sar., 2001; Chiang i sar., 2003a; Chiang i sar., 2003b; Gálvez i sar., 2003; Krasnov i sar., 2003; Park i Chang, 2004; Velasco-Lezama i sar., 2006; Fleer i Verspohl, 2007). S obzirom da je jedan od ciljeva ispitivanja u ovom radu bila karakterizacija ekstrakata odabranih vrsta bokvica kao antioksidantnih i antiinflamatornih agenasa, u *Poglavlju 2.1.3.2.* i *Poglavlju 2.1.3.3.* prikazan je pregled literature koji pokazuje dosadašnje podatke o antioksidantnom i antiinflamatornom potencijalu ovog roda.

Identifikacijom niza bioaktivnih jedinjenja i dokazivanjem biološke aktivnosti, objašnjava se i podržava primena nekih vrsta bokvica (*P. asiatica* L., *P. lanceolata* L., *P. major* L., *P. media* L.) u tradicionalnoj medicini. Naime, u tradicionalnoj medicini evropskih naroda izuzetno su cenjene vrste *P. lanceolata*, *P. major* i *P. media*, dok je u azijskoj narodnoj medicini najzastupljenija *P. asiatica* L. Sok iz sveže *P. lanceolata* (Sarić, 1989) se u narodu upotrebljava spolja za lečenje rana i kao sredstvo protiv zapaljenja (antibakterijsko dejstvo). U oficijelnoj medicini, upotreba ove vrste je takođe odobrena, te se *P. lanceolata* koristi u obliku čaja za ublažavanje nadražaja kod katara

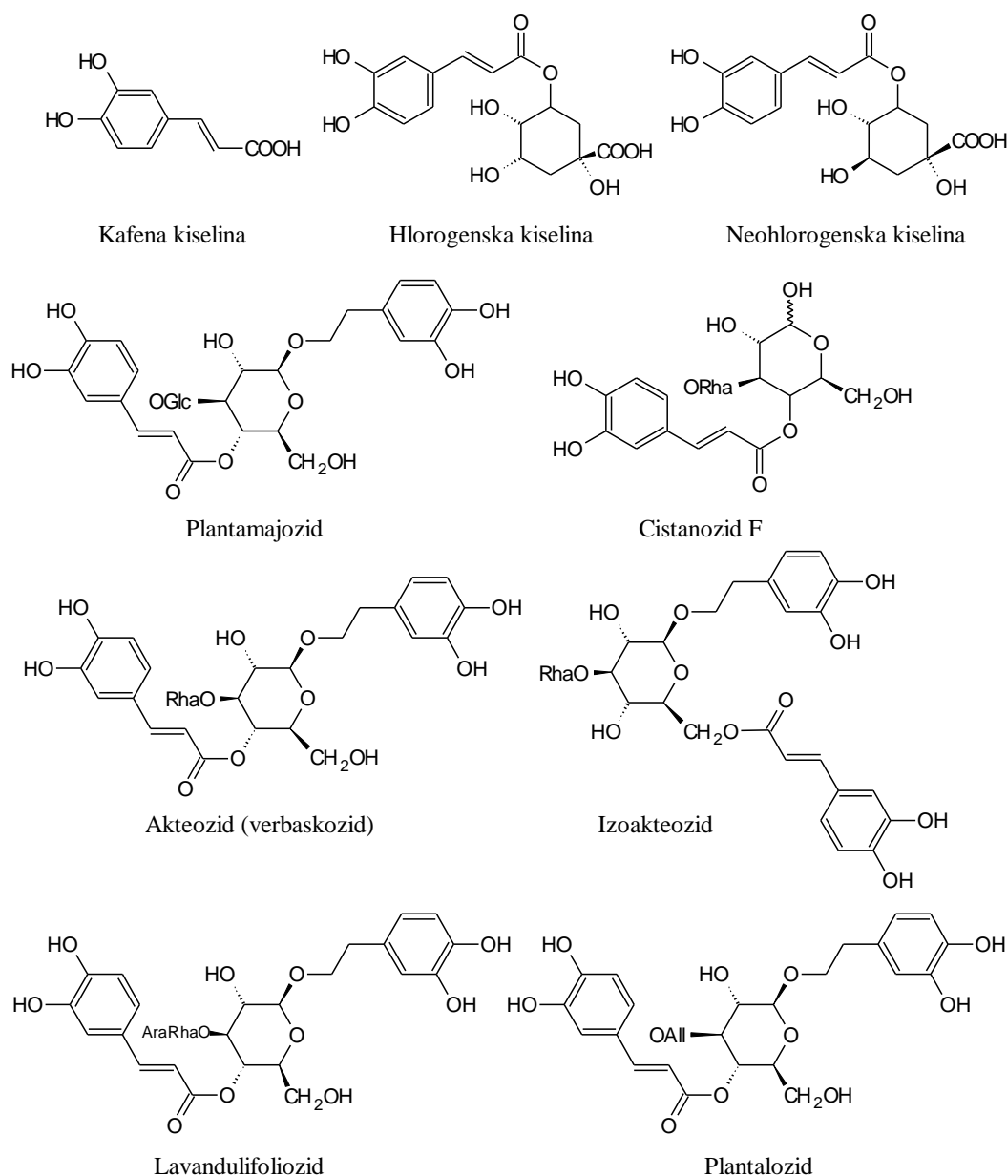
gornjih delova organa za disanje, a macerat, tečni ekstrakt sirup, sok sveže biljke ili pastile, koriste se pri lečenju zapaljenja usta i grla (Wichtl, 1994). Lišće *P. major* jedno je od najpopularnijih narodnih medikamenata za lečenje rana, ujeda od insekata, ali i kašlja, bolesti organa za varenje (proliv, katar, grčevi, čir na dvanaestopalačnom crevu i želucu) ili urinarnog trakta (Tucakov, 1997; Sarić, 1989). Tradicionalna upotreba *P. media* vrlo je slična upotrebi *P. major* (Sarić, 1989). Seme vrsta *P. afra* L. (*P. psyllium* L.), *P. indica* L. (tradicionalno u Evropi, Sarić, 1989), *P. ovata* Forsk. (tradicionalno u Egiptu i Indiji, Jasrai i sar., 1993) i *P. asiatica* L. koriste se u lečenju konstipacije i dijareje (Wichtl, 1994; WHO, 1999). Pored fitofarmaceutske primene, *P. asiatica*, *P. coronopus* i *P. major* koriste se i u ishrani, najčešće kao sveže pripremljena salata (Jančić, 2002; Heimler i sar., 2007; Chon i sar., 2008).

### **2.1.3.1. Fenolna jedinjenja u vrstama roda *Plantago* L.**

Niz literaturnih podataka ukazuje na visoki sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ispitivanim vrstama roda *Plantago* (Gálvez i sar., 2003; Jurišić-Grubešić i Vladimir-Knežević, 2004; Gálvez i sar., 2005a; Jurišić-Grubešić i sar., 2005; Katalinić i sar., 2006; Pourmorad i sar., 2006; Heimler i sar., 2007; Murai i sar., 2008; Chon i sar., 2008). Značajnu grupu ove klase jedinjenja prisutnih u vrstama roda *Plantago* predstavljaju feniletanoidi, derivati kafene kiseline (Slika 2.13.).

U metanolnom ekstraktu *P. major* utvrđeno je prisustvo etil i metil estra kafene kiseline (Pailer i Haschke-Hofmeister, 1969), a u vodenom hlorogenske i neohlorogenske kiseline (Maksyutina, 1971a). Međutim, najzastupljeniji derivati kafene kiseline u *P. major* su akteozid (verbaskozid) i plantamajozid (Noro i sar., 1991; Skari i sar., 1999a; Egorov i sar., 2004), koji pokazuju značajnu antiinflamatornu, antioksidantnu, antibakterijsku, imunosupresivnu i analgetsku aktivnost (Samuelsen, 2000). Mølgaard (1986) navodi da se ova dva jedinjenja ne mogu naći zajedno u istoj biljci, kao i da podvrste mogu da sadrže različite odnose. Murai i saradnici (1995) izolovani su iz metanolnog ekstrakta *P. lanceolata* akteozid, kao dominantni feniletanoid, zatim cistanozid F, lavandulifoliozid, plantamajozid i izoakteozid (Slika 13.). Ista grupa autora utvrdila je i razlike u sadržaju dominantnog feniletanoida u vrstama *P. lanceolata* (akteozid, 3-8%), odnosno *P. major* i *P. asiatica* (plantamajozid, 2-4%). Prisustvo plantamajozida u *P. asiatica* dokazali su i Choi i saradnici (2008a). Franzyk i saradnici

(1998) izolovali su plantalozid i verbaskozid iz etanolnog ekstrakta *P. myosuros* Lam. Prisustvo verbaskozida potvrđeno je i u ekstraktima *P. coronopus* (Heimler i sar., 2007), *P. serraria* (Gálvez i sar., 2005a) i *P. bellardii* (Gálvez i sar., 2005b). U vrstama *P. altissima* L., *P. argentea* Chaix., *P. coronopus* L., *P. holostium* Scop., *P. lagopus* L. i *P. maritima* L. nije utvrđeno prisustvo kafene kiseline, dok je hlorogenska kiselina detektovana samo u ekstraktu *P. lagopus* (Jurišić-Grubešić i Vladimir-Knežević, 2004).



Slika 2.13. Kafena kiselina i njeni derivati prisutni u vrstama roda *Plantago*

Druga značajna klasa fenolnih jedinjenja prisutnih u vrstama roda *Plantago* su flavonoidi, sekundarni metaboliti biljaka, za koje se smatra da su izuzetno potentni

antioksidantni agensi, ali oni takođe ispoljavaju i antiinflamatorno, antialergijsko, antimikrobno i antikancerogeno dejstvo (Havsteen, 2002). Literaturni podaci ukazuju na prisustvo kako aglikona, tako i flavonoidnih glikozida u vrstama roda *Plantago* (Hahnagy i sar., 1976; Lebedev-Kosov i sar., 1978; Kawashty i sar., 1994; Chiang i sar., 2003b; Jurišić-Grubešić i Vladimir-Knežević, 2004; Gálvez i sar., 2005a; Gálvez i sar., 2005b; Heimler i sar., 2007). U *Tabeli 2.1.* dat je pregled literaturnih podataka o kvalitativnom sadržaju flavonoida prisutnih u vrstama roda *Plantago*, koje su ispitivane u ovom radu.

*Tabela 2.1.* Pregled literaturnih podataka o flavonoidima detektovanim u navedenim vrstama roda *Plantago*

Vrsta	Flavonoidna jedinjenja prisutna u ekstraktu	Reference
<i>P. altissima</i>	Izokvercitrin	Jurišić-Grubešić i Vladimir-Knežević, 2004
<i>P. argentea</i>	Izokvercitrin	Jurišić-Grubešić i Vladimir-Knežević, 2004
<i>P. bellardii</i>	Rutin	Gálvez i sar., 2005b
<i>P. coronopus</i>	Izokvercitrin	Jurišić-Grubešić i Vladimir-Knežević, 2004
<i>P. holosteam</i>	Hiperozid, izokvercitrin, kvercitrin	Jurišić-Grubešić i Vladimir-Knežević, 2004
<i>P. lanceolata</i>	Apigenin, apigenin-6,8-di- <i>C</i> -glukozid, apigenin-7- <i>O</i> -glukozid, apigenin-7- <i>O</i> -glukuronid, apigenin-7- <i>O</i> -glukuronilglukozid, luteolin, luteolin-7- <i>O</i> -glukozid, luteolin-7- <i>O</i> -glukuronid, luteolin-7- <i>O</i> -glukuronid-3'-glukozid, luteolin-7- <i>O</i> -glukuronilglukozid	Kawashty i sar., 1994
<i>P. major</i>	Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid, bajkalein, hispidulin, hispidulin-7- <i>O</i> -glukuronid, homoplantagin, luteolin-7- <i>O</i> -glukozid, luteolin-7- <i>O</i> -diglukozid, luteolin 6-hidroksi-4'-metoksi-7- <i>O</i> -galaktozid, nepetin-7- <i>O</i> -glukozid, plantagin, skutelarein	Maksyutina, 1971b; Harborne i Williams, 1971; Kawashty i sar., 1994; Nishibe i sar., 1995; Skari i sar., 1999b
<i>P. maritima</i>	Hiperozid, izokvercitrin	Jurišić-Grubešić i Vladimir-Knežević, 2004

Pregled literaturnih navoda pokazuje da ima vrlo malo podataka kako o kvalitativnom, tako i o kvantitativnom sadržaju flavonoida u vrstama roda *Plantago* koje su ispitivane u ovom radu. Naime, osim *P. lanceolata* i *P. major*, druge vrste (*P. argentea*,

*P. bellardii*, *P. coronpous*, *P. holosteum* i *P. maritima*) su izuzetno malo okarakterisane u smislu flavonoidnog sadržaja, dok o pojedincima (*P. media*, *P. schwarzenbergiana*, *P. reniformis*), po našem saznanju, nema literaturnih podataka. Sa ciljem da se izvrši određena fitohemijska karakterizacija ispitivanih ekstrakata odabranih vrsta roda *Plantago*, pored određivanja sadržaja ukupnih fenola i flavonoida spektrofotometrijskom metodom, u ovom radu je urađena i kvantifikacija više flavonoida (aglikona i glukozida) primenom LC-MS/MS tehnike.

### **2.1.3.2. Vrste roda *Plantago* L. kao antioksidantni agensi**

Najobimnija ispitivanja biološke aktivnosti vrsta roda *Plantago* urađena su u cilju određivanja antioksidantnog potencijala ovog roda. Razlog za ispitivanje ove aktivnosti je prvenstveno prisustvo brojnih fenolnih komponenti u vrstama roda *Plantago*, ali i prisupačnost i jednostavnost eksperimentalne tehnike za njeno određivanje. Međutim, do sada je ispitan antioksidantni potencijal samo devet, od preko 250 vrsta roda *Plantago*. Pregled vrsta, primenjenih antioksidantnih testova i referenci dat je u Tabeli 2.2.

Svi rezultati prikazanih testova (Tabela 2.2.), koji se odnose na kapacitet „hvatanja“ DPPH<sup>•</sup> i ABTS<sup>•+</sup> radikala, inhibiciju lipidne peroksidacije, Fe<sup>2+</sup> helatacionu aktivnost ili ukupni antioksidantni status, pokazuju da ispitane vrste roda *Plantago* imaju određenu antioksidantnu aktivnost. Budući da je u većini testova ispitivana antioksidantna aktivnost različitih vrsta ekstrakata, kao i da se eksperimentalni uslovi razlikuju u primenjenim testovima, nije moguće porediti antioksidantni potencijal, niti okarakterisati pojedinačnu vrstu bokvice kao najbolji antioksidantni agens. Ipak, na osnovu dobijenih podataka, može se zaključiti da ove vrste poseduju znatan antioksidantni potencijal i da postoji potreba za daljom karakterizacijom neispitanih vrsta, kao što su npr. *P. argentea*, *P. holosteum* i *P. maritima*, *P. media*, *P. schwarzenbergiana* i *P. reniformis*. Deo biohemijskih ispitivanja urađen u ovom radu odnosi se upravo na detaljno određivanje antioksidantnog potencijala odabranih vrsta bokvica i to u smislu neutralizacije DPPH<sup>•</sup> radikala, odnosno kapaciteta „hvatanja“ hidroksil, superoksid anjon i azot(II)-oksid radikala, redukcionog potencijala (FRAP test) i inhibicije lipidne peroksidacije.

Tabela 2.2. Pregled literaturnih podataka o antioksidantnoj aktivnosti vrsta roda *Plantago*

Vrsta	Test	Reference
<i>P. afra</i>	Kapacitet „hvatanja“ DPPH <sup>•</sup> radikala, inhibicija Fe <sup>2+</sup> /askorbat indukovane lipidne peroksidacije u lipozomima goveđeg mozga	Gálvez i sar., 2005a
	Inhibicija peroksidacije linoleinske kiseline	Khalil i sar., 2007
<i>P. asiatica</i>	Kapacitet „hvatanja“ DPPH <sup>•</sup> radikala	Chon i sar., 2008
	Kapacitet „hvatanja“ DPPH <sup>•</sup> i ABTS <sup>•+</sup> radikala, Fe <sup>2+</sup> helataciona aktivnost	Choi i sar., 2008b
<i>P. bellardii</i>	Kapacitet „hvatanja“ DPPH <sup>•</sup> radikala, inhibicija Fe <sup>2+</sup> /askorbat indukovane lipidne peroksidacije u lipozomima goveđeg mozga	Gálvez i sar., 2005b
<i>P. coronopus</i>	Kapacitet „hvatanja“ DPPH <sup>•</sup> radikala, inhibicija Fe <sup>2+</sup> /askorbat indukovane lipidne peroksidacije u lipozomima goveđeg mozga	Gálvez i sar., 2005a
	Kapacitet „hvatanja“ DPPH <sup>•</sup> radikala, Fe <sup>2+</sup> helataciona aktivnost	Heimler i sar., 2007
<i>P. lagopus</i>	Kapacitet „hvatanja“ DPPH <sup>•</sup> radikala, inhibicija Fe <sup>2+</sup> /askorbat indukovane lipidne peroksidacije u lipozomima goveđeg mozga	Gálvez i sar., 2005a
<i>P. lanceolata</i>	Ukupni antioksidantni status	Herold i sar., 2003
	Kapacitet „hvatanja“ DPPH <sup>•</sup> radikala, inhibicija Fe <sup>2+</sup> /askorbat indukovane lipidne peroksidacije u lipozomima goveđeg mozga	Gálvez i sar., 2005a
	Kapacitet „hvatanja“ superoksid anjon radikala	Al-Mamun i sar., 2007
<i>P. major</i>	Kapacitet „hvatanja“ superoksid anjon radikala, inhibicija lipidne peroksidacije	Çoban i sar., 2003
	Kapacitet „hvatanja“ DPPH <sup>•</sup> radikala	Pourmorad i sar., 2006
	Kapacitet „hvatanja“ DPPH <sup>•</sup> radikala	Stanisavljević i sar., 2008
	Kapacitet „hvatanja“ DPPH <sup>•</sup> radikala, FRAP test	Katalinić i sar., 2006
<i>P. ovata</i>	Inhibicija peroksidacije linoleinske kiseline	Souri i sar., 2008
	Inhibicija peroksidacije linoleinske kiseline	Souri i sar., 2008
<i>P. serraria</i>	Kapacitet „hvatanja“ DPPH <sup>•</sup> radikala, inhibicija Fe <sup>2+</sup> /askorbat indukovane lipidne peroksidacije u lipozomima goveđeg mozga	Gálvez i sar., 2005a

### 2.1.3.3. Vrste roda *Plantago* L. kao antiinflamatorni agensi

Pored niza lekovitih svojstava, antiinflamatorna aktivnost vrsta roda *Plantago* posebno je cenjena u narodnoj medicini. Iako su u tradicionalnoj medicini evropskih naroda *P. major* i *P. lanceolata* najzastupljenije, a u Kini i ostalim azijskim zemljama *P. asiatica* L., svi navodi ukazuju na izuzetnu aktivnost ovih vrsta pri različitim povredama i inflamacijama kože. Međutim, literaturnih podataka o farmakološkim ispitivanjima antiinflamatornog potencijala ima izuzetno malo i njihov pregled dat je u Tabeli 2.3. Većina objavljenih radova odnosi se na aktivnost ekstrakata vrsta *P. major* i *P. lanceolata*, koje su utvrđene primenom različitih *in vitro* i *in vivo* testova (Guillén i sar., 1997; Marchesan i sar., 1998; Gomez-Flores i sar., 2000; Vigo i sar., 2005; Turel i sar., 2009).

Tabela 2.3. Pregled literaturnih podataka o antiinflamatornoj aktivnosti ekstrakata i jedinjenja detektovanih u vrstama roda *Plantago*

Vrsta	Ispitivana komponenta	Test	Reference
<i>P. australis</i>	Etanolni ekstrakt	Karaginan-indukovani edem u zadnjoj šapi pacova	Palmeiro i sar., 2002
<i>P. lanceolata</i>	Izolovani feniletanoidi akteozid, cistanozid F, lavandulifoliozid, plantamajozid i izoakteozid	Arahidonskom kiselinom indukovani edem na ušima miševa	Murai i sar., 1995
	Tečni ekstrakti	Modifikovani test natrijum-dodecil sulfatom indukovane iritacije horioalantoične membrane kokošijeg jajeta (HET-CAM)	Marchesan i sar., 1998
	Ekstrakt	Inhibicija produkcije NO i PGE <sub>2</sub> , uticaj na NO sintazu tipa II, COX-1 i COX-2 mRNA ekspresiju u J774A.1 makrofagnoj ćelijskoj liniji miševa	Vigo i sar., 2005
	Izolovani feniletanoid akteozid	Inhibicija intestinalne inflamacije u <i>in vivo</i> testu natrijum-sulfat-	Hausmann i sar., 2007



		dekstranom indukovanog kolitisa kod miševa	
<i>P. major</i>	Vodeni ekstrakt	Karaginan i dekstran- indukovani edem u šapi miševa	Guillén i sar., 1997
	Urosolna i oleanolna kiselina izolovane iz heksanskog ekstrakta	<i>In vitro</i> inhibicija mikrozomalne COX-1 iz goveđih seminalnih vezikula <i>In vitro</i> inhibicija COX- 2 izolovane iz ovčijih placentalnih kotiledona	Ringbom i sar., 1998
	Ekstrakt lišća	<i>In vitro</i> uticaj ekstrakta na produkciju NO i TNF- $\alpha$ u makrofagama peritoneuma pacova i konkavalin A- indukovanu limfoproliferacije	Gomez-Flores i sar., 2000
	Masne kiseline (linolna, $\alpha$ -linoleinska, miristinska i palmitinska) izolovane iz metilenhlordnog ekstrakta	<i>In vitro</i> inhibicija mikrozomalne COX-1 iz goveđih seminalnih vezikula <i>In vitro</i> inhibicija COX- 2 izolovane iz ovčijih placentalnih kotiledona	Ringbom i sar., 2001
	Metanolni ekstrakt semena	Karaginan-indukovani edem u šapi pacova	Turel i sar., 2009
<i>P. ovata</i>	Seme	Intestinalna antiinflamatorna aktivnost kod HLA-B27 transgenskih pacova	Rodríguez- Cabezas i sar., 2003.
Rod <i>Plantago</i>	Iridoidi aukubin, katalpol, genipozid, genipozidinska kiselina prisutni u vrstama roda <i>Plantago</i>	Inhibicija COX-1 u humanim ćelijama eritroleukemije (HEL ćelije) Inhibicija COX-2 u RAW 264.7 ćelijama	Park i sar., 2007

Antiinflamatorna i analgetska aktivnost etanolnog ekstrakta lišća, korena i ploda *P. australis* Lam. je utvrđena *in vivo* značajnim smanjenjem karaginan-indukovanog edema u šapi pacova i abdominalnih grčeva (*writing test*) indukovanih sirćetnom kiselinom kod miševa, pri peroralnoj upotrebi ovih ekstrakata (Palmeiro i sar., 2002).

Ekstrakti *P. lanceolata* prisutni su u glavnom kao aktivni sastojci lekova za ublaživanje nadražaja kod katara gornjih delova organa za disanje ili za lečenje rana kao sredstvo protiv zapaljenja. Međutim, postoji vrlo malo literaturnih podataka o farmakološkim testovima koji bi dokazali antiinflamatornu aktivnost ekstrakta ove vrste. Ispitivanje antiinflamatornog potencijala koje su sprovedi Marchesan i sar. (1998) na modelu natrijum-dodecil sulfatom indukovane iritacije horioalantoične membrane kokošijeg jajeta (HET-CAM), potvrđuje potentnu aktivnost različito pripremljenih ekstrakata *P. lanceolata* pri inhibiciji iritacije membrane. Takođe, *P. lanceolata* ekstrakt inhibira produkciju NO<sup>•</sup> radikala u J774A.1 makrofagnoj ćelijskoj liniji miševa, pokazuje dobru sposobnost „hvatanja“ NO<sup>•</sup> radikala, a pretretiranje ovim ekstraktom vodi inhibiciji produkcije mRNA induktibilne NO sintaze (iNOS) u ovoj ćelijskoj liniji, bez uticaja na COX-1 mRNA ekspresiju (Vigo i sar., 2005). Budući da nivoi COX-2 mRNA i PGE<sub>2</sub>, indukovani lipopolisaharid/interferon- $\gamma$  sistemom, nisu bili promenjeni prilikom pretretmana sa *P. lanceolata* ekstraktom, antiinflamatorna aktivnost ove vrste verovatno je posledica sposobnosti smanjenja produkcije i neutralizacije NO<sup>•</sup> radikala, kao i inhibicije ekspresije iNOS gena.

Guillén i saradnici (1997) ispitivali su antiinflamatorno i analgetsko dejstvo vodenog ekstrakta *P. major*. Rezultati pokazuju da je kod životinja pretretiranih vodenim ekstraktom *P. major* (1 g/kg, p.o.) došlo do smanjenja otoka u šapi i pleritisa indukovanih karaginanom, ali i da nije bilo uticaja na edem indukovan dekstranom. Takođe, antiinflamatorni efekat ovog vodenog ekstrakta bio je intenzivniji u slučaju edema na uhu miša indukovano karaginanom, nego krotonovim uljem. Nakon osmodnevnog tretmana vodenim ekstraktom *P. major* (1 g/kg/dan) potpuno je inhibiran proces lučenja, indukovan krotonskim uljem injektovanim u šapu pacova. Uporedo sa antiinflamatornom aktivnošću, isti autori dokazali su i analgetsko dejstvo ovog ekstrakta: peroralnom primenom znatno su smanjeni abdominalni grčevi (*writing test*) indukovani sirćetnom kiselinom kod miševa, ali nije bilo uticaja na reakciju pomeranja repa pri toplotnoj stimulaciji.

Metanolni ekstrakt smena *P. major* pokazuje značajnu antiinflamatornu aktivnost ispitivanu na modelu karaginanom indukovano edema na šapi pacova (Turel i sar., 2009).

Interesantno je da pored antiinflamatorne aktivnosti, ekstrakt ove vrste bokvica pokazuje i imunostimulišuću aktivnost. Naime, Gomez-Flores i saradnici (2000) ispitivali su *in vitro* uticaj metanolnog ekstrakta lišća *P. major* na makrofage peritoneuma pacova i funkciju limfocita timusa. Zbog važne uloge makrofaga u moduliranju humoralnog i ćelijskog imuniteta prema infektivnim bolestima ili kanceru, značajni su podaci o imunološkoj aktivnosti koji se mogu dobiti praćenjem medijatora citotoksičnosti. Medijator, koje luče aktivirane makrofage, kao što su azot(II)-oksid (NO) i  $\alpha$ -faktor nekroze tumora (*tumor nekrosis factor- $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ) štite ćeliju od razvoja infekcije ili tumora. Sa druge strane, T-limfociti utiču na proliferaciju i razvijanje antigen-specifičnih klonova limfocita i na taj način pružaju antigensku zaštitu i pojačavaju imuni odgovor. Limfokini, koje luče T-ćelije, potpomažu proliferaciju i diferencijaciju T- i B-limfocita, kao i makrofaga. Funkcionalna proliferacija T-ćelija može se proučavati na modelu poliklonalnih mitogena, kao što su konkavalin A (Con A) i fitohemagglutinin (PHA), koji se vezuju za ugljenohidratne ostatke na površinskim glikoproteinima T-ćelije, uključujući i receptore T-ćelije i CD3 protein, i na taj način stimulišu proliferativni odgovor T-ćelije. Rezultati ovih ispitivanja pokazali su da metanolni ekstrakt lišća *P. major* podstiče produkciju NO i TNF- $\alpha$  u makrofagama i stimuliše proliferaciju limfocita. Podaci o imunostimulišućoj aktivnosti ovog ekstrakta značajni su kako za preventivnu primenu, zbog toga što podsticanjem nespecifičnog imunog odgovora ćelije, većina patogena može biti uništena pre nego što se pojave simptomi bolesti, tako i za kliničku primenu, jer regulacija imunih parametara indukovana biljnim ekstraktima može biti izuzetno važna za lečenje velikog broja bolesti uključujući hronične viralne infekcije, tuberkulozu, HIV i kancer.

U skladu sa upotrebom *P. ovata* (konstipacija, dijareja, ulcerozni kolits, Kronova bolest), Rodríguez-Cabezas i sar. (2003) ispitivali su mehanizam odgovoran za interstinalnu antiinflamatornu aktivnost vlakana *P. ovata* u eksperimentalnom modelu kolitisa kod pacova. Test se odnosio na efekat ishrane obogaćene semenom *P. ovata* (5%) kod HLA-B27 transgenskih pacova, pri čemu su praćeni i uticaji na produkciju medijatora inflamacije, kao što su citokini, TNF $\alpha$ , LTB $_4$  i NO. Seme *P. ovata* kao suplement deluje preventivno na razvoj inflamacije u ispitivanom modelu spontanog kolitisa, što je najverovatnije posledica smanjenja koncentracije intestinalnih medijatora, do koje dolazi zbog povećane produkcije masnih kiselina kratkog lanca (propionat i butirat). Naime, kod životinja u čiju ishranu je bilo uključeno seme *P. ovata*, značajno je bila smanjena koncentracija fekalnog propionata i butirata. Uticaj ovih masnih kiselina može biti

višestruk: one mogu biti energetski supstrati kolonocitima, olakšati obnavljanje intestinalne barijere i sprečavanje agenasa koji doprinose inflamatornom procesu ili sinergistički modulirati imuni odgovor regulacijom na primer proinflammatora citokina, jer održavanje njihovog nivoa u intestinumu značajno doprinosi smanjenju i sprečavanju inflamacije.

Iako postoji vrlo malo literaturnih podataka o antiinflamatornoj aktivnosti ekstrakata, rezultati dobijeni ispitivanjem klasa jedinjenja prisutnih u vrstama roda *Plantago*, nedvosmisleno ukazuju na potrebu za detaljnim ispitivanjem antiinflamatornog potencijala ovog roda. Naime, iridoidi (Park i sar., 2007), feniletanoidi (Murai i sar., 1995; Hausmann i sar., 2007), masne kiseline (Ringbom i sar., 1998; Ringbom i sar., 2001) i flavonoidi (Schneider i Buchar, 2005) izolovani iz ekstrakata ovog roda mogu biti potentni promotori antiinflamatorne aktivnosti. Posebnu pažnju u ovoj grupi prirodnih proizvoda privlače iridoidi, monoterpenska ciklična jedinjenja, čije prisustvo u svim vrstama roda *Plantago* predstavlja osnov za njihovu hemotaksonomsku klasifikaciju, ali i farmaceutska ispitivanja, jer je biološka aktivnost ovih sekundarnih biomolekula izuzetno raznolika (Didna i sar., 2005). Pored kardiovaskularne, antihepatotoksične, antimikrobne, antipiretičke, antiviralne, antitumorne, hipoglikemijske, imunomodulatorne kao i antispazmolitičke aktivnosti, iridoidi mogu biti i antiinflamatorni agensi. Park i saradnici (2007) ispitivali su COX-1/2 inhibitorni potencijal i uticaj na TNF- $\alpha$  i NO produkciju sedam iridoidnih glukozida (aukubina, katalpola, gentiopikrozida, svertiamarina, genipozida, genipozidinske kiseline i loganina), kao i aglikona genipinina. Ni jedan iridoidni glukozid, kao ni aglikon genipinin, nisu pokazali aktivnost ni u jednom od primenjenih testova. Međutim, nakon pre-tretiranja glukozida  $\beta$ -glukozidazom, inače prisutne u biljkama, sva jedinjenja su pokazala izvesnu aktivnost, čiji potencijal je zavisio od njihove hemijske strukture. Hidrolizovani proizvod aukubina (H-aukubin) pokazao je umerenu COX-2 i slabu COX-1 inhibiciju, dok su H-loganin i H-genipozid potentno inhibirali COX-1, a vrlo slabo COX-2. H-aukubin, H-katalpol, H-genipozid i H-loganin znatno su uticali na smanjenje produkcije TNF- $\alpha$ , dok je samo H-aukubin bio aktivan pri supresiji NO. Ovi rezultati potvrđuju da je za ispoljavanje biološke aktivnosti ključna faza hidroliza glikozidne veze iridoidnih glukozida, ali i ukazuju na zavisnost farmakološkog potencijala vrste od prisutnih iridoidnih jedinjenja, odnosno njihove hemijske strukture.

U pogledu antiinflamatorne aktivnosti feniletanoida prisutnih u vrstama *Plantago*, akteozid (*P. lanceolata*) deluje na inhibiciju intestinalne inflamacije u *in vivo* modelu akutnog kolitisa kod miševa (natrijum-sulfat-dekstranom indukovani kolitis; Hausmann i

sar., 2007), dok pored akteozida i plantamajozid (*P. major*, *P. asiatica*) deluje na inhibiciju arahidonskom kiselinom indukovano edema uha miševa (Murai i sar., 1995).

Ringbom i saradnici (1998) izolovali su ursolnu kiselinu kao najaktivniju komponentu heksanskog ekstrakta *P. major*. Rezultati testova urađenih na izolovanim COX-1 i COX-2 enzimima pokazuju da je urosolna kiselina potentni inhibitor oba enzima, pri čemu pokazuje veću aktivnost od oleanoinske kiseline (strukturni izomer), i umerenu selektivnost. Ispitujući COX-2 inhibitornu aktivnost prirodnih i sintetskih masnih kiselina, ista grupa istraživača (Ringbom i sar., 2001) odredila je i antiinflamatorni potencijal linolne,  $\alpha$ -linoleinske, miristinske i palmitinske kiseline, izolovanih iz metilenhlordnog ekstrakta *P. major*. Iako miristinska i palmitinska kiselina nisu pokazale aktivnost pri primenjenim eksperimentalnim uslovima, linolna i  $\alpha$ -linoleinska kiselina, ispoljile su izuzetnu COX-1/2 selektivnost, inhibirajući znatno bolje COX-2.

Uopšteno, ispitane vrste roda *Plantago*, kao i njihovi aktivni metaboliti, pokazuju izvesnu antiinflamatornu aktivnost. Iako tradicionalna medicina svedoči o antiinflamatornom potencijalu nekoliko vrsta, a čija upotreba je i prihvaćena u savremenoj fitoterapiji (*P. asiatica*, *P. lanceolata*, *P. major*, *P. ovata*), opsežnija ispitivanja aktivnosti drugih predstavnika ovog roda nisu do sada urađena. Uzimajući u obzir i da sekundarni metaboliti prisutni u vrstama roda *Plantago* mogu biti potentni antiinflamatorni agensi, ekstrakti ovih vrsta svakako predstavljaju potencijalni izvor medijatora inflamacije i ukazuju na neophodnost njihove detaljne farmakološke karakterizacije.

## **2.2. Slobodni radikali i antioksidantni potencijal**

### **2.2.1. Slobodni radikali i oksidativni procesi**

Poslednjih decenija sve veći značaj imaju saznanja o slobodnim radikalima, oksidativnom stresu koji oni mogu da izazovu i antioksidantima kao supstancama koje ga sprečavaju. Neki autori smatraju da je ravnoteža između slobodnih radikala i antioksidanata nezamenljivi deo životnog ciklusa: antioksidanti služe da smanje prisustvo slobodnih radikala, dopuštajući im pri tome da obavljaju svoje biološke funkcije bez izazivanja velike štete (Halliwell i Gutteridge, 2006).

Po osnovnoj definiciji, slobodni radikali su atomi, joni ili molekuli, koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi (Cadenas i Davies, 2000). Nespareni elektroni su uzrok njihove visoke i neselektivne reaktivnosti i nestabilnosti. Slobodni

radikali mogu biti neutralni, ali i pozitivno (radikal katjon) i negativno (radikal anjon) naelektrisani. Nespareni elektron može se nalaziti na C-atomu, kao kod alkil radikala ( $\cdot\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\cdot$ ), na O-atomu, kao kod alkoksil-, hidroksil-, peroksil- i superoksid anjon radikala ( $\text{RO}\cdot$ ,  $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{O}_2\cdot^-$ ), na N-atomu, kao kod azotmonoksidnog radikala ( $\text{NO}\cdot$ ) ili na S-atomu, kao kod tiol radikala ( $\text{RS}\cdot$ ). Nespareni elektron imaju i atom vodonika ( $\text{H}\cdot$ ) i halogena ( $\text{Cl}\cdot$ ), alkalni metali ( $\text{Na}\cdot$ ), kao i neki joni metala ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ). Postoje dva osnovna mehanizama nastajanja radikala: transfer jednog elektrona na neradikalnu vrstu ili homolitičko raskidanje kovalentne veze. Stabilnost slobodnih radikala predstavlja termodinamičku karakteristiku koja zavisi od sposobnosti ostalog dela molekula da stabilizuje nespareni elektron, tako da se na osnovu relativne stabilnosti slobodni radikali mogu okarakterisati kao nepostojani („kratkoživeći“) i postojani („dugoživeći“; Cadenas i Davies, 2000). Uopšteno, reaktivne vrste se mogu podeliti na reaktivne slobodnoradikalske i neradikalske vrste, odnosno oksidaciona sredstva koja lako prelaze u slobodne radikale.

Slobodnoradikalske vrste se mogu podeliti na reaktivne vrste kiseonika (*reactive oxygen species*, ROS), hlora (*reactive chlorine species*, RCS), broma (*reactive bromine species*, RBS) i azota (*reactive nitrogen species*, RNS; Halliwell, 2006). Reaktivne vrste kiseonika (ROS) su opšti termin koji uključuje i kiseonikove radikale i određene neradikalske vrste koje su oksidativna sredstva i/ili se lako prevode u radikale:  $\text{HOCl}$ ,  $\text{HOBr}$ ,  $\text{O}_3$ ,  $\text{ONOO}\cdot$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Shodno tome, svi kiseonični radikali jesu ROS, ali svi ROS nisu samo radikalske vrste kiseonika (Halliwell, 2006). Reaktivne vrste kiseonika i azota su endogeni intermedijeri koji neprekidno nastaju u živim ćelijama i imaju esencijalnu ulogu u regulaciji fizioloških procesa. Oni su jedinjenja koja učestvuju u signalizaciji ćelijskih funkcija kao što su proliferacija, inflamacija i adhezija. Neke ROS učestvuju u proizvodnji energije, fagocitozi, regulaciji ćelijskog rasta, signalizaciji ćelijskih funkcija i sintezi biološki važnih jedinjenja. Mnoge biološke aktivnosti npr. azot(II)-oksida posledica su upravo njegove radikalske prirode.

Slobodni radikali na nekoliko načina reaguju sa primarnim biomolekulima: mogu da se adiraju na molekul i izazovu njegovo oštećenje (npr. adicija  $\text{HO}\cdot$  na DNK), mogu da abstrahuju proton (npr. iz ugljovodoničnog niza membranske nezasićene masne kiseline, izazivajući lipidnu peroksidaciju), mogu da budu redukujući (doniranje jednog elektrona) ili oksidativni (abstrakcija jednog elektrona) agensi, pri čemu su proizvodi ovih reakcija nove radikalske vrste, čime zapravo započinje lančana reakcija. Snažan uticaj na formiranje ROS ima niz faktora, kao što su iradijacija, zagađenje vazduha, pušenje, i sl.

Obzirom da reaktivne vrste kiseonika nastaju i u ćelijskim metaboličkim procesima, ćelije su razvile nekoliko zaštitnih mehanizama u cilju sprečavanja nastajanja ili neutralizacije ROS. Ćelijski antioksidativni sistem čine različiti endogeni proteini, koji mogu da vezuju metalne jone i na taj način sprečavaju katalizu na primer Fentonove reakcije, zatim neproteinski biomolekuli (npr. askorbat, tokoferol) i enzimi, kao na primer superoksid dizmutaza, glutation peroksidaza, peroksiredoksini i sl., koji mogu da katalizuju prevođenje radikalskih u neradikalske vrste (Halliwell, 2006). Međutim, narušavanje oksido-reduktivne ravnoteže dovodi do stanja oksidativnog stresa, čije posledice su tzv. oksidativno oštećenje, odnosno različite patološke manifestacije. Poznato je da ROS mogu da „napadaju“ lipide ćelijskih membrana, proteine tkiva ili enzime, ugljene hidrate i DNK, uzrokuju oksidaciju i time izazivaju oštećenja membrana i DNK i modifikuju proteine (Pietta i sar., 1998). Reakcija ćelije na oksidativni stres može biti različita i zavisi od vrste ćelije i nivoa oksidativnog stresa. Najčešće se povećava koncentracija intracelularnog  $\text{Ca}^{2+}$ , prelaznih metala koji mogu da katalizuju slobodnoradikalske reakcije, ili dolazi do proliferacije, što može biti dobro kod npr. zarastanja rana, ali loše ako vodi fibrozi tkiva. U ćelijama takođe može da dođe do intenzivnijeg delovanja sisteme odbrane i reparacije, što može u potpunosti ili samo delimično da zaštititi ćeliju. Umereni oksidativni stres najčešće ne oštećuje ćeliju u potpunosti, već u glavnom onemogućava njenu deobu. Određena oksidativna oštećenja, posebno ona na lancu DNA, izazivaju apoptozu, odnosno nekrozu ćelije. Kliničke studije su pokazale da su reaktivne vrste kiseonika povezane sa mnogim degenerativnim bolestima starenja uključujući aterosklerozu i brže starenje, vazospazme, reumu, moždani udar, astmu, artritis, infarkt srca, dermatitis, kataraktogenezu, oštećenje retine, hepatitis i oštećenje jetre. Ishrana bogata biljkama doprinosi smanjenju rizika od razvijanja ovih bolesti, zahvaljujući mnoštvu antioksidanata (askorbat, tokoferoli, flavonoidi, karotenoidi), koji su prisutnih u njima (Halliwell, 2009).

### ***2.2.2. In vitro metode za određivanje antioksidantnog potencijala***

Budući da je nivo slobodnih radikala u direktnoj vezi sa procesima oksidacije kako u hrani, tako i u biološkim sistemima, metode za određivanje neutralizacije slobodnih radikala, odnosno antioksidantnog potencijala imaju široku primenu. U pogledu ispitivanja hrane, neophodno je odrediti efikasnost prirodnih antioksidanata pri zaštiti od oksidativnog oštećenja hrane, kao i antioksidantni kapacitet različitih biljaka, sa ciljem da

se ishrana obogati vrstama koje su potentni „hvatači“ slobodnih radikala. Određivanjem antioksidantnog statusa u biološkim sistemima može se pratiti uticaj ishrane na oksidativni stres i doprinos u prevenciji bolesti čiji uzročnici su oksidativna oštećenja (Sánchez-Moreno, 2002).

Efikasnost antioksidanata se određuje merenjem inhibicije oksidacije odgovarajućeg supstrata. Nakon što se pod strandarnim uslovima supstrat oksiduje, stepen oksidacije (završna tačka) se meri hemijskim, instrumentalnim ili senzornim metodama. Stoga su osnovni delovi svakog testa pogodan supstrat, inicijator oksidacije i odgovarajući način za merenje završne tačke. Kombinacije supstrata, inicijatora i završne tačke su mnogobrojne i sa istim tehnikama je moguće izvesti nekoliko različitih analitičkih postupaka (Sanchez-Moreno, 2002).

Uopšteno, testovi za određivanje antioksidantnog potencijala u biološkim sistemima i namirnicama mogu biti zasnovani na:

- sposobnosti „hvatanja“ slobodnih radikala
- transferu elektrona
- inhibiciji lipidne peroksidacije

U daljem tekstu, biće prikazan sažet pregled osnovnih principa na kojima su zasnovane neke od ovih metode. Iz prve grupe, prikazani su testovi koji određuju sposobnost „hvatanja“ superoksid anjon radikala, hidroksil radikala, peroksil radikala, vodonik-peroksida, hipohlorne kiseline, azot(II)-oksida i peroksinitrita. Zatim je dat pregled pojedinih testova za merenje antioksidantnog kapaciteta u kojima se odigrava transfer elektrona (DPPH<sup>•</sup>, TEAC i FRAP test). Takođe, predstavljene su i pojedine metode za određivanje sposobnosti antioksidanasa da inhibiraju lipidnu peroksidaciju.

*Određivanje kapaciteta „hvatanja“  $O_2^{\bullet-}$*  meri se procentom inhibicije stvaranja  $O_2^{\bullet-}$ , koji se može generisati u dve vrste sistema. Prvi sistem podrazumeva neenzimsku reakciju fenazin-metilsulfata (PMS) u prisustvu NADH i molekuskog kiseonika, gde se PMS ponaša kao prenosilac elektrona, a u drugom slučaju,  $O_2^{\bullet-}$  se generiše u enzimskom, hipoksantin/ksantin-oksidaza sistemu. U oba sistema se za merenje procenta inhibicije koristi reakcija redukcije superoksidom nitro-plavo tetrazolijuma (NBT, bezbojan) u formazan (plav). Količina neutralisanih radikala prati se spektrofotometrijski na 560 nm i proporcionalna je smanjenju intenziteta obojenja (Sánchez-Moreno, 2002). Još jedan način



merjenja sposobnosti „hvatanja“  $O_2^{\bullet-}$  je gasno-hromatografsko praćenje oslobođenog etena u reakciji generisanog  $O_2^{\bullet-}$  sa  $\alpha$ -ketometiolbuternom kiselinom (KMB). Takođe, može se primeniti i elektron spin rezonantna (ESR) spektrofotometrija, gde se generisani anjon „hvata“ 5,5-dimetil-1-pirolin-*N*-oksidom (DMPO), a nastali DMPO-OH adukt detektuje ESR-om uz mangan oksid kao interni standard (MacDonald-Wicks i sar., 2006).

*Sposobnost neutralizacije hidroksil radikala ( $HO^{\bullet}$ )* se može odrediti pomoću „deoksiriboza testa“. Smeša gvožđe-hlorida ( $FeCl_3$ ) i etilendiamin-tetraacetatne kiseline (EDTA) u prisustvu askorbinske kiseline reaguje i nastaju Fe(II)-EDTA kompleks i oksidovani oblik askorbata. Fe(II)-EDTA zatim reaguje sa  $H_2O_2$  i prelazi u Fe(III)-EDTA stvarajući  $HO^{\bullet}$  (Fentonova reakcija). Ovi slobodni radikali napadaju deoksiribozu i razgrađuju je do serije fragmenta od kojih neki, npr. malonildialdehid (MDA), zagrevanjem i na niskom pH reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) i daju proizvod roza boje. Ukoliko se izostavi dodavanje askorbata, ova metoda se može koristiti za određivanje pro-oksidantnog svojstva supstanci, pri čemu pro-oksidanti zamenjuju askorbat u Fentonovoj reakciji. Druga modifikacija ove reakcije može poslužiti za određivanje helatnih agenasa. Naime, stvaranje  $HO^{\bullet}$  u Fentonovoj reakciji je omogućeno prisustvom gvožđa. Da bi se identifikovala jedinjenja koja kompleksiraju Fe(II), deoksiriboza test se vrši bez prisustva EDTA. Kada je prisutan helatni agens, manje se produkuje  $HO^{\bullet}$ , oštećenja izazvana radikalom su manja i zbog toga je slabiji intenzitet boje nakon reakcije sa TBA (Sanchez-Moreno, 2002).

Budući da je hidroksil radikal jako reaktivan *in vivo*, sposobnost „hvatanja“ koju ispoljava određeni molekul može biti pomalo irelevantna u živom sistemu. Zbog toga je mnogo značajnije meriti sposobnost molekula da vezuje metalne jone, a molekul koji ima ovu sposobnost bi se mogao nazvati preventivni antioksidant. Princip testa za merenje ove sposobnosti, HORAC testa (*hydroxyl radical averting capacity*), sastoji se u tome da se hidroksil radikal stvori Fentonovom reakcijom sa Co(II), a sposobnost „hvatanja“ se prati promenom intenziteta obojenja rastvora fluorescina (FL; MacDonald-Wicks i sar., 2006). Sposobnost „hvatanja“  $HO^{\bullet}$  može se određivati i ESR-om, kao i u sistemu nazvanom 3D (*damaged DNA detection*), gde se prati stepen oštećenja DNA izazvan hidroksil radikalima generisanim u Fentonovoj reakciji (Sánchez-Moreno, 2002).

*Određivanje kapaciteta „hvatanja“ peroksil radikala* najčešće se ispituje testovima u kojima se koriste azo-jedinjenja kao generatori peroksl radikala. Ovi sistemi podrazumevaju korišćenje npr. 4,4-difluoro-3,5-bis-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacina kao indikatora i 2,2'-azobis-2,4-dimetilvaleronitrila kao generatora  $ROO^{\bullet}$ ,

zatim 2,2'-azobis-(2-amidopropan) dihidrohlorida (ABAP) u svojstvu generatora radikala i lipozoma kao supstrata podložnog lipidnoj peroksidaciji, ili 2,2'-azobis-(2-imidazolin-2-il) propana i linoleinske kiseline. TRAP test (*total radical-trapping antioxidant parameter assay*) je metoda razvijena za određivanje antioksidantnog statusa humane plazme u kojoj se peroksil radikal generiše termalnom dekompozicijom vodorastvornog azo-inicijatora, npr. ABAP-a. ORAC test (*oxygen radical absorbance capacity assay*) je zasnovan na praćenju promene fluorescencije B-fikoertrina ili fluoresceina u prisustvu ABAP-a kao generatora  $\text{ROO}^\bullet$  i odgovarajućih antioksidanasa, a rezultat se izražava na osnovu standardne krive Trolox-a. Takođe, poznat je i test izbeljivanja karotenoida krocina, gde do izbeljivanja dolazi dejstvom  $\text{ROO}^\bullet$  nastalih iz ABAP-a. Reakcija se odigrava u fosfatnom puferu, a praćenje se vrši spektrofotometrijski na 443 nm (Sánchez-Moreno, 2002; MacDonald-Wicks i sar., 2006).

*Određivanje kapaciteta „hvatanja“ vodonik peroksida* se lako može izvesti primenom peroksidaznog testa. Najčešće se upotrebljava peroksidaza iz rena, koja koristi  $\text{H}_2\text{O}_2$  da oksiduje skopoletin u nefluorescentni proizvod, a u prisustvu aktivnog antioksidansa, ova oksidacija može biti inhibirana (Sánchez-Moreno, 2002). Neenzimska metoda za određivanje sposobnosti „hvatanja“  $\text{H}_2\text{O}_2$  se zasniva na merenju hemiluminiscencije u reakciji luminola sa hipohloritom. Luminol se pomoću natrijum-hipohlorita oksiduje do diazahinona u dvoelektronskoj oksidaciji. Diazahinon se zatim pomoću  $\text{H}_2\text{O}_2$  konvertuje u pobuđeni aminoftalat. Signal luminiscencije je veoma kratak (2s), meri se na 431 nm i linearno je zavistan od koncentracije  $\text{H}_2\text{O}_2$  (min. konc.  $10^{-9}$  mol/L; MacDonald-Wicks i sar., 2006).

*Kapaciteta hvatanja hiophlorne kiseline* može se takođe odrediti u *in vitro* testovima, a jedna od metoda za određivanje sposobnosti „hvatanja“  $\text{HOCl}$  zasniva se na korišćenju  $\text{MPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{NaCl}$  sistema u prisustvu 1-aminociklopropan-karboksilne kiseline (ACC), pri čemu se prati oslobađanje etena. Druga metoda podrazumeva generisanje  $\text{HOCl}$  iz natrijum hipohlorida i dodatak  $\alpha_1$ -antiproteinaze i odgovarajućeg antioksidanta. Nakon inaktivacije enzima hipohlornom kiselinom, dodaje se elastaza, čiju aktivnost će onemogućiti ostatak aktivne  $\alpha_1$ -antiproteinaze. Step aktivnosti elastaze određuje se spektrofotometrijski (410 nm), na osnovu preostale koncentracije njenog supstrata, *N*-sukciniltriala-*p*-nitroanilida (Sánchez-Moreno, 2002).

*Određivanje kapaciteta „hvatanja“ azot(II)-oksida*, jednog od najznačajnijih medijatora inflamatornih procesa, zasnovano je najčešće na spektrofotometrijskom merenju neutralizacije nitritnih jona generisanih iz vodenog rastvora natrijum-nitroprusida

pri fiziološkom pH. Nastali  $\text{NO}^*$  reaguje sa kiseonikom dajući nitritne jone, čija koncentracija se određuje po metodi Green-a i sar. (1982), a koja se zasniva na spektrofotometrijskom određivanju purpurno-ružičastog diazo kompleksa koji nastaje nakon reakcije  $\text{NO}_2^-$  i Griees-ovog reagensa (smeša N-(1-naftil)-etilendiamin dihidrohlorida i sulfanilamida u 4% fosornoj kiselinu) na sobnoj temperaturi.

*Određivanje kapaciteta „hvatanja“ peroksinitrita*, citotoksične reaktivne vrste, koja nastaje reakcijom azot(II)-oksida i superoksid anjona u endotelnim ćelijama, neutrofilima i makrofagama, može se odrediti merenjem promene fluorescencije dihidrorodamina 123 u fluorescentni rodamin 123, u prisustvu ili odsustvu odgovarajućeg antioksidansa (Sánchez-Moreno, 2002).

*Određivanje neutralizacije DPPH<sup>\*</sup> (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikala* postiže se lakim, tačnim i komercijalno dostupnim testom (Sánchez-Moreno, 2002). I pored izvesnih nepogodnosti (MacDonald-Wicks i sar., 2006), ovaj test se smatra pouzdanom, validnom i jednostavnom metodom za određivanje aktivnosti antioksidansa, jer je radicalska komponenta stabilna i ne mora da se sintetiše, kao što je to slučaj u drugim testovima. Ova metoda se zasniva na bojenoj reakciji gde se na 515-528 nm meri smanjenje apsorpcije usled reakcije antioksidansa sa etanolnim ili metanolnim rastvorom stabilnog DPPH<sup>\*</sup> radikala. Sánchez-Moreno (2002) predlaže novu metodologiju za evaluaciju antiradikalne efikasnosti prema DPPH<sup>\*</sup>: procedura uzima u obzir ne samo koncentraciju antioksidansa, već i vreme reakcije koje je potrebno da se postigne plato neutralizacije aktivnosti.

*„Trolox equivalent antioxidant capacity“ (TEAC)* je test koji je u širokoj upotrebi za testiranje antioksidativnog kapaciteta u uzorcima hrane. Bazira se na smanjenju apsorpcije 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiatolin-6-sulfonat) radikalnog katjona ( $\text{ABTS}^{*+}$ ) pod dejstvom antioksidanasa, koji mogu da inhibiraju njegovo stvaranje.  $\text{ABTS}^{*+}$ , radikal plavo-zelene boje, generiše se enzimatski pomoću sistema koji formiraju  $\text{H}_2\text{O}_2$  i peroksidazu rena. Reakcija se prati na talasnoj dužini između 400 i 750 nm. Rezultati antioksidantne aktivnosti dobijeni u ovom testu se izražavaju u ekvivalentima Trolox-a (Sanchez-Moreno, 2002.).

*Redoks potencijal (ferric ion reducing antioxidant power, FRAP test)* standardnih jedinjenja ili ispitivane smeše može se jednostavno odrediti testom koji se zasniva na redukciji  $\text{Fe}^{3+}$ -tripiridiltriazin ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) kompleksa do  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ delovanjem antioksidanasa kao donora elektrona pri čemu se razvija intenzivno plava boja sa apsorpcionim maksimumom na 593 nm. Međutim, navedena reakcija je nespecifična i svaki sistem koji ima manje pozitivan redoks potencijal od sistema  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ/ $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ

će voditi ka redukciji  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ. Redoks potencijal  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ (0.70 V) je veoma sličan redoks potencijalu ABTS<sup>•+</sup> te su male razlike između FRAP i TEAC testova. Najveća razlika je u tome što se TEAC test izvodi u neutralnoj sredini, a FRAP u kiselim uslovima (MacDonald-Wicks i sar., 2006).

*Lipidna peroksidacija* je oksidativno oštećenje koje zahvata ćelijske membrane, lipoproteine i druge molekule koji sadrže lipide. Lipidi ćelijske membrane (fosfolipidi, glikolipidi i holesterol) su najčešći supstrati oksidativnog napada slobodnih radikala. Proces lipidne peroksidacije teče kroz tri faze: inicijaciju, propagaciju i terminaciju, a kao krajnji produkti mogu nastati malonildialdehid (MDA), izoprostani, 4-hidroksinoneal i sl. MDA može da reaguje sa amino grupama proteina, formirajući intramolekulske unakrsne veze ili vezujući dva različita proteina intramolekulskim vezama i time menjajući njihove strukturno-funkcionalne osobine.

Testovi koji se koriste za merenje moći antioksidansa da vrše supresiju lipidne peroksidacije zasnivaju se na proceni jačine oksidacije lipidnog supstrata u prisustvu ili u odsustvu potencijalnog antioksidantnog molekula ili biljnog ekstrakta. Postoje četiri različite strategije za procenu antioksidantnog kapaciteta molekula prema lipidnom supstratu i one uključuju merenje potrošnje kiseonika, gubitak supstrata i formiranje primarnih i sekundarnih produkata oksidacije (Laguerre i sar., 2007).

Prva metoda za određivanje stepena lipidne peroksidacije, koja podrazumeva merenje potrošnje kiseonika, zasniva se na praćenju faze inicijacije i njenog produžetka u prisustvu antioksidansa. Druga metoda je zasnovana na merenju gubitka supstrata u sistemima kao što su uzorci namirnica ili biološki uzorci i izuzetno je komplikovana, jer u njima postoji veliki broj potencijanih oksidabilnih supstrata koje je teško identifikovati. Praćenje primarnih produkata oksidacije, za razliku od strategije merenja zasnovane na gubitku supstrata, je metoda veoma dobro adaptirana za proučavanje kako model, tako i složenih sistema (uzorci namirnica, biološki uzorci) i najčešće podrazumeva spektrofotometrijsko određivanje koncentracije hidroperoksida, dominantnih primarnih produkata lipidne peroksidacije. Praćenje sekundarnih produkata oksidacije je takođe metoda pogodna za izučavanje lipidnih model sistema, kao i lipida izolovanih iz njihovog prirodnog okruženja (mikrozomi, lipoproteini niske gustine (*low-density lipoprotein*, LDL) i sl.). I u *in vitro* i u *in vivo* ispitivanjima veoma često se koristi TBA (tiobarbiturna kiselina) test za detekciju malonildialdehida (MDA), sekundarnog produkta oksidacije. Ovaj test uključuje reakciju TBA sa MDA, pri čemu nastaje crvena hromofora sa maksimumom apsorpcije na 532 nm. Ova reakcija ima široku primenu i njom je vršena

determinacija mnogih oksidabilni supstrata, kao supstanci koje reaguju sa TBA (*tiobarbitric acid-reactive substances*, TBARS), uključujući slobodne masne kiseline, LDL i telesne fluide (urin, serum) iz ćelija i tkiva. Ipak, ova metoda ima izvesne nedostatke. Prvi je da se MDA formira samo iz slobodnih masnih kiselina koje sadrže bar tri dvostruke veze, kao što je linolenska kiselina, isključujući time produkte raspadanja linolne i oleinske kiseline. Drugo, TBA nije specifična za MDA jer može da reaguje sa drugim aldehydima, bojeći u braon produkte reakcije razgradnje proteina i šećera, amino kiselina i nukleinskih kiselina. Konačno, MDA se ne stvara kod oksidacije mnogih lipida i često je manje bitan sekundarni produkt oksidacije, stoga nije dovoljno reprezentativan za pojedina merenja. Iz tog razloga su razvijene tehnike koje imaju veću specifičnost prema MDA: prečišćavanje TBA/MDA kompleksa HPLC-om i kvantifikacija fluorometrijskim detektorom (Tatum i sar., 1990), razdvajanje HPLC-om i spektrofotometrijska detekcija (Wong i sar., 1987), određivanje u stabilnom tetrametilacetalu pomoću GC-FID (*gas chromatography - flame ionization detector*) analize i u metilpirazolu GC analizom kombinovanom sa azot/fosforim detektorom (Laguerre i sar., 2007).

## **2.3. Metabolizam arahidonske kiseline**

### **2.3.1. Arahidonska kiselina i eikozanoidi**

Eikozanoidi, farmakološki i fiziološki medijatori, obuhvataju četiri klase jedinjenja: prostaglandine (PG), tromboksane (TX), leukotriene (LT) i lipoksine (LX) i imaju jednu od ključnih uloga u mnogim patološkim procesima u ljudskom organizmu. Slično hormonima, oni ispoljavaju fiziološke efekte pri veoma niskim koncentracijama, ali se za razliku od mnogih drugih hormona, eikozanoidi ne deponuju u ćelijama, već su njihova sinteza i oslobađanje trenutni, u momentu stimulacije. Eikozanoidi ispoljavaju svoj efekat na ćeliju posredstvom G-proteinskih receptora. Različiti G-proteini, aktivirani interakcijom sa odgovarajućim receptor-ligand (eikozanoid) kompleksom, utiču na koncentraciju sekundarnih „messenger“ sistema (ciklični AMP, inozitoltrisfosfat (IP<sub>3</sub>), inozitoltetrafosfat (IP<sub>4</sub>), diacilglicerol (DAG) ili Ca<sup>2+</sup>) ili intracelularnih jona (K<sup>+</sup> ili, najverovatnije Na<sup>+</sup> i H<sup>+</sup>) tako što stimulišu ili inhibiraju adenilat ciklazu, aktiviraju fosfolipazu C, otvaraju i zatvaraju Ca<sup>2+</sup> i K<sup>+</sup> kanale, ili utiču na Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> izmenu. Mnoštvo bioloških efekata koje ispoljavaju eikozanoidi posledica je postojanja različitih receptora,

specifičnih za određeni eikozanoid, a koji se mogu kuplovati samo sa određenim G proteinom, odgovornim za odgovarajuću biološku aktivnost (Smith, 1989).

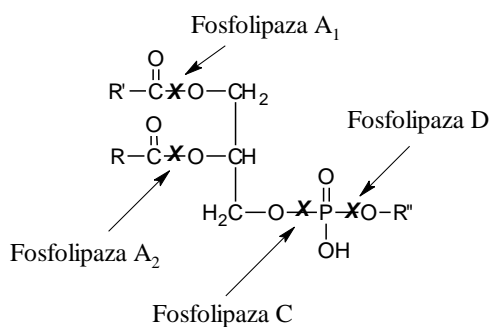
Eikozanoidi predstavljaju grupu biološki aktivnih jedinjenja nastalih u metabolizmu nezasićenih masnih kiselina koje imaju 20 atoma ugljenika (grčki: *eicosa* - dvadeset) i tri, četiri ili pet dvostrukih veza. Kod ljudi je najčešća zajednička preteča svih eikosanoida arahidonska kiselina (5,8,11,14-eikosatetraen-kiselina), višestruko nezasićena masna kiselina sa 20 C-atoma i četiri dvostruke veze. Kao takva, arahidonska kiselina se unosi hranom ili može nastati iz esencijalne linolenske kiseline (Koračević i sar., 1996). Sposobnost sinteze eikosanoida imaju sve ćelije ljudskog organizma osim eritrocita, a njihovo prisustvo dokazano je i u životinjskim i biljnim ćelijama.

Kako se arahidonska kiselina najčešće nalazi u esterifikovanom obliku, ugrađena u fosfolipide ćelijske membrane, sintezi eikosanoida prethodi njeno oslobađanje iz ovih estara. Uopšteno, veliki broj fizičkih, hemijskih i hormonskih stimulusa, različitih kod različitih tipova ćelija, može da pokrene oslobađanje arahidonske kiseline direktno ili indirektno aktivirajući jednu od specifičnih fosfolipaza (acil-hidrolaza). Tako je, na primer, trombin stimulus za trombocite, C5a za neutrofile, bradikinin za fibroblaste, a reakcija antigen-antitelo za mastocite. Oštećenje ćelija takođe pokreće ovaj proces (Rang i sar., 2004; Abbas i Lichtman, 2006).

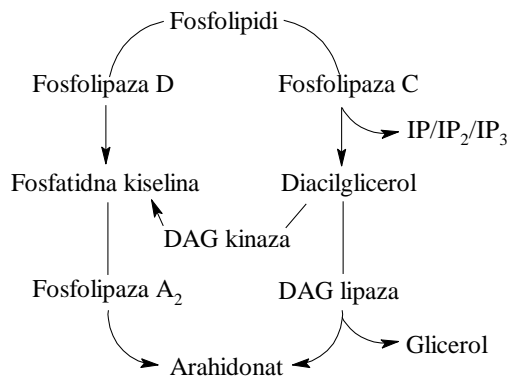
Smatra se da se na nivou hidrolize estara ove kiseline ostvaruje regulacija brzine sinteze eikosanoida. Fosfolipaza koja načešće katališe reakciju oslobađanja arahidonske kiseline je intracelularna fosfolipaza A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), koja može da utiče i na stvaranje lizogliceril-fosforilholina (lizo-PAF), prekursora još jednog medijatora inflamacije, PAF-a. Zapravo, postoje tri grupe fosfolipaza A<sub>2</sub>: sekretorne (sPLA<sub>2</sub>), od kojih tip IIA i V učestvuju u inflamatornim procesima, celularne (cPLA<sub>2</sub>), podeljene u pet grupa, od kojih su PLA<sub>2</sub>-α, PLA<sub>2</sub>-β, PLA<sub>2</sub>-γ i iPLA<sub>2</sub> (kalcijum-nezavisna (*calcium-independent*) PLA<sub>2</sub>) do sada najbolje proučene, i PLA<sub>2</sub> koje hidrolizuju PAF ili oksiduju fosfolipide. Pri sintezi eikosanoida, aktivacija cPLA<sub>2</sub> postiže se fosforilacijom cPLA<sub>2</sub> pomoću različitih kinaza i njenom translokacijom do membranskih fosfolipida putem kalcijum-vezujućih domena, praćenu povećanjem intracelularnog Ca<sup>2+</sup>, koji omogućava pristup citosolnom enzimu do membranskog supstrata (Leslie, 1997). U pogledu sPLA<sub>2</sub> tipa II, postoje samo indirektni dokazi koji ukazuju da ovaj enzim u *in vivo* sistemima može da vrši hidrolizu ćelijskih fosfolipida i da generiše medijatore. Kod nekoliko ćelijskih sistema je dokazano da tretiranje inflamatornim citokinima dovodi do povećanja sinteze prostaglandina i sPLA<sub>2</sub> tipa II. Ovaj enzim se akumulira u Goldžijevom aparatu gradeći kompleks sa proteoglikanima.

Manji deo enzima se zadržava intracelularno, dok se veći deo sekretuje i nalazi u kompleksu sa proteoglikanima na površini ćelije, gde može doći do hidrolize. Kako sPLA<sub>2</sub> tipa II i V nisu sintetizovane kao neaktivni proenzimi, u *in vivo* sistemima je neophodno postojanje mehanizma koji sprečava prevremenu hidrolizu. Brojne studije su pokazale da sekretovani enzimi ne mogu da hidrolizuju fosfolipide plazma membrane u intaktnoj ćeliji. Zbog toga se smatra da je aktivacija enzima zapravo posledica oštećenja membrane ili sinergističkog dejstva sfingomijelaze. Sfingomijelin inhibira aktivnost PLA<sub>2</sub> tipa II, dok holesterol, koji se kompleksira sa sfingomijelinom snažno utiče na smanjenje inhibicije. Takođe, aktivnost sPLA<sub>2</sub> tipa II regulisana je i polipeptidnim faktorima, kao što su PLAP (proteini koji aktiviraju fosfolipazu, *phospholipase activating proteins*) ili aneksinima (Curtis-Prior, 2004).

Oslobađanje arahidonske kiseline može se odigrati u jedno- (Slika 2.14.) ili dvostepenom procesu (Slika 2.15.; Rang i sar., 2004).



Slika 2.14. Jednostepeno oslobađanje arahidonske kiseline iz fosfolipida (R/R'- O-acil ostatak arahidonske kiseline ili drugih masnih kiselina, R''-holin, etanolamin, serin, inozitol ili vodonik)

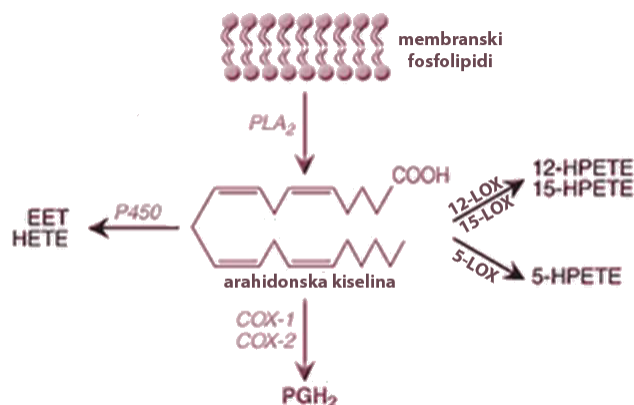


Slika 2.15. Dvostepeno oslobađanje arahidonske kiseline iz fosfolipida (IP- inozitol fosfat, DAG- diacilglicerol)

U jednostepenom procesu (Slika 2.14.), arahidonska kiselina, koja se najčešće nalazi u *sn*-2 položaju fosfolipida oslobađa se direktnim dejstvom PLA<sub>2</sub>, dok su u dvostepeni proces (Slika 2.15.) uključene i fosfolipaze D i C, DAG (diacilglicerol) kinaza i lipaza, kao i PLA<sub>2</sub>. Fosfolipaza C specifično hidrolizuje fosfatidilinozitol uz nastajanje inozitoltrifosfata (IP<sub>3</sub>) i 1,2-diacilglicerola (DAG). DAG se može hidrolizovati pomoću diacilglicerol lipaze i odgovoran je za nastanak slobodne arahidonske kiseline. Fosfolipaza

D također može uzrokovati nastanak DAG preko fosfatidinske kiseline, a samim tim i slobodne arahidonske kiseline.

Slobodna arahidonska kiselina dalje podleže procesu oksidacije tako da, zavisno od aktivnosti specifičnih enzima, metabolički put može ići u tri različita pravca, a prema nazivu ključnih enzima to su: ciklooksigenazni, lipooksigenazni i epoksigenazni put biosinteze eikosanoida (*Slika 2.16.*).

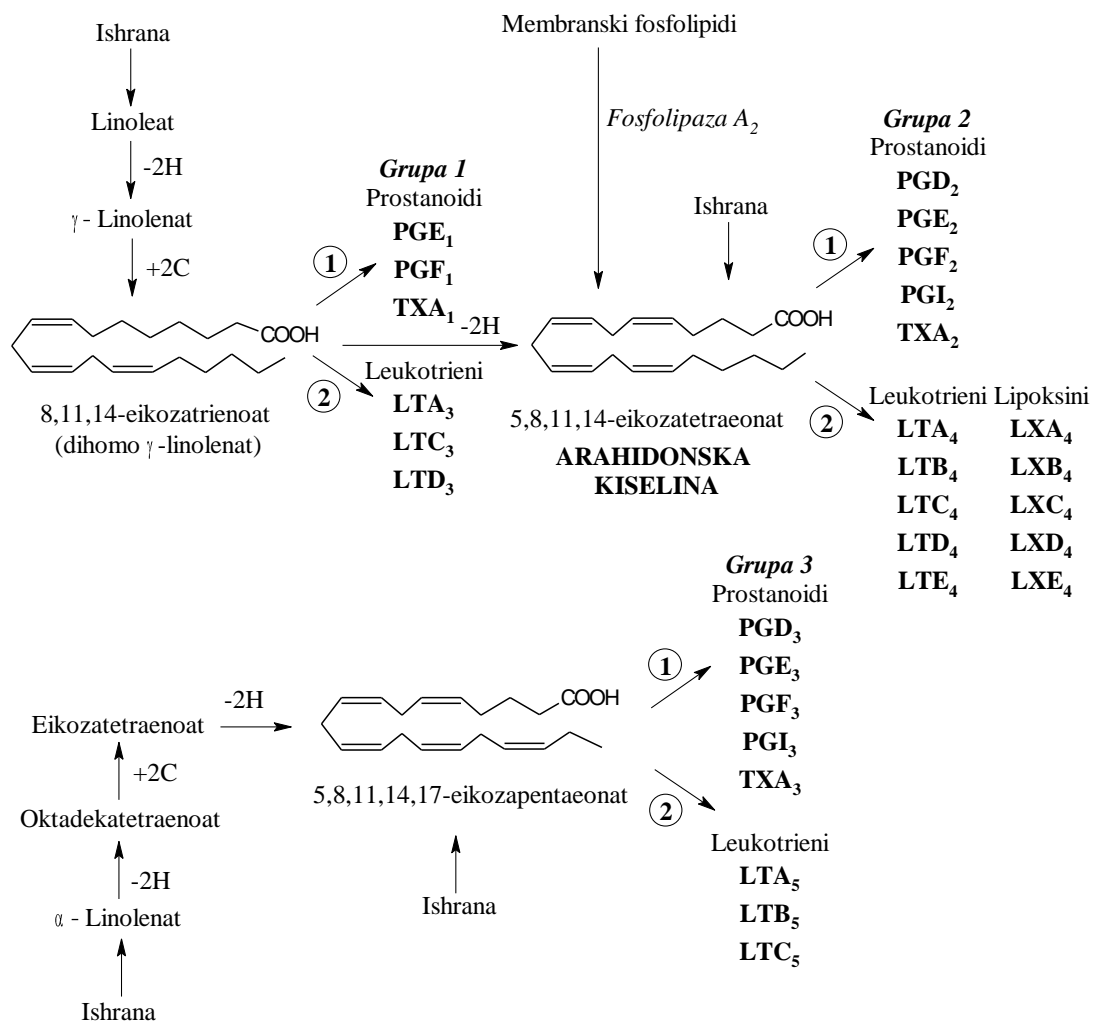


*Slika 2.16.* Metabolizam slobodne arahidonske kiseline ([www.niehs.nih.gov](http://www.niehs.nih.gov))

( $PLA_2$  – fosfolipaza  $A_2$ ,  $P450$  – citohrom  $P450$ ,  $EET$  - epoksieikosatrien-kiselina,  $HETE$  - hidroeikosatetraen-kiselina,  $COX$  – ciklooksigenaza,  $PGH_2$  – prostaglandin  $H_2$ ,  $LOX$  – lipooksigenaza,  $HPETE$  - hidroperoksieikosatetraen-kiselina)

U ciklooksigenaznom i lipooksigenaznom metabolizmu arahidonske kiseline nastaju tri grupe eikosanoida: *grupa 1, 2 i 3* (*Slika 2.17.*). Njihovi biosintetski prekursori su esencijalne masne kiseline linoleat i  $\alpha$ -linolenat, ili direktno arahidonat i eikosapentaenoat. Sinteza  $PG_2$  i  $TX_2$  serije (prostanoidi; supskript označava ukupan broj dvostrukih veza u molekulu) se ostvaruje ciklooksigenaznim (1), dok se sinteza  $LT_4$  i  $LX_4$  serije ostvaruje lipooksigenaznim putem (2), pri čemu dolazi do kompeticije ciklo- i lipooksigenaze za arahidonatni supstrat. Slične reakcije odigravaju se i pri sintezi  $PG$  i  $TX$  iz grupe 2 i 3 (Mayes i Botham, 2003).

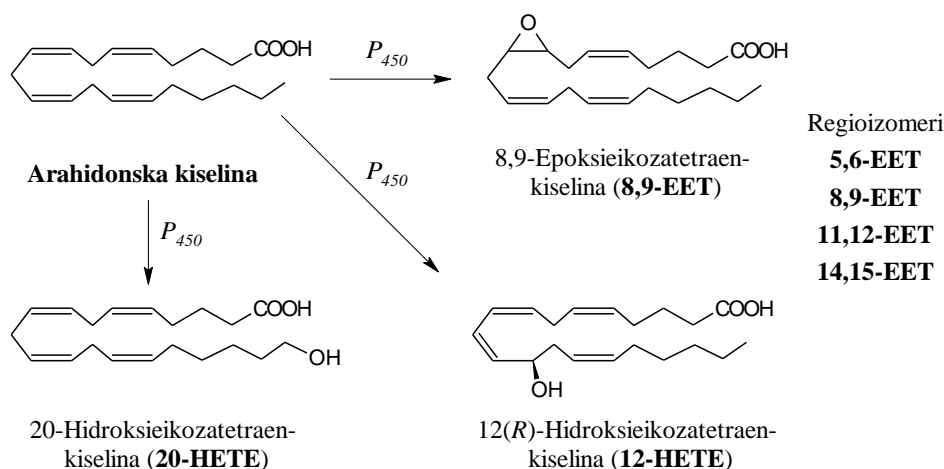




Slika 2.17. Nastajanje tri grupe eikozanoida i njihovi biosintetski prekursori (PG-prostaglandin, PGI-prostaciklin, TX-tromboksan, LT-leukotrien, LX-lipoksin; 1-ciklooksigenazni put, 2-lipooksigenazni put)

U epoksigenaznom putu metabolizma arahidonske kiseline nastaje veliki broj oksidacionih metabolita, epoksida (Slika 2.18.; Curtis-Prior, 2004). Naime, delovanjem enzima citohrom P-450, monooksigenaze, dolazi do umetanja kiseonika u jednu od četiri dvostruke veze arahidonske kiseline, pri čemu nastaju regioizomerne epoksieikozatrien-kiseline (*epoxy-eicosatrienoic acid*, EET). Ova jedinjenja, za razliku od prostaglandina, mogu biti inkorporisana u fosfolipide, koji su onda njihovo mesto skladištenja. Takođe, ova jedinjenja poseduju veoma veliku biološku aktivnost sa različitim svojstvima, odnosno mogu da mobilišu mikrozomalni kalcijum, inhibiraju jonski transport, deluju na glatke mišićne ćelije, trombocite, a smatra se i da imaju važnu ulogu u funkciji bubrega. Nastanak ovih produkata oksidacije zavisi od aktivnosti citohroma P-450 i raspoloživog  $\text{O}_2$  (Catella i sar., 1990). Pored epoksida, produkti ovog puta mogu bit i 20-hidroksi,

odnosno 20-karboksi kiseline nastale  $\omega$ -oksidacijom arahidonske kiseline, kao i proizvodi slični proizvodima lipooksigenaznog puta, ali suprotne stereochemije (12(*R*)-HETE).



Slika 2.18. Biosintetski produkti dobijeni dejstvom različitih citohrom P-450 izoenzima na arahidonsku kiselinu: reakcije formiranja četiri različita regioizomera epoksieikozatetraen-kiseline (EET), reakcija slična reakcijama lipooksigenaznog puta (proizvod 12(*R*)-HETE) i  $\omega$ -oksidacija (primer nastajanje 20-HETE).

### 2.3.2. Ciklooksigenazni put metabolizma arahidonske kiseline

Sinteza prostanoida (PG i TX) iz arahidonske kiseline započinje adicijom dva molekula kiseonika na arahidonsku kiselinu, a katalizovana je prostaglandin H sintazom (PGHS ili ciklooksigenaza, COX), bifunkcionalnim enzimom koji ispoljava aktivnost ciklooksigenaze i peroksidaze. Postoje zapravo dva izoenzimska oblika ciklooksigenaze: COX-1 i COX-2 (Pairet i Engelhardt, 1996). COX-1 se sastoji od 602, a COX-2 od 604 amino kiseline i oko 80% aminokiselinskog sastava identično je kod oba enzima, sa najizraženijim razlikama na C-, N-terminusu i heliksima u vezivnom centru. COX-1, za razliku od COX-2, ima hidrofobnu sekvencu od 17 amino kiselina na N-terminusu. Nasuprot tome, COX-2 sadrži fragment od 18 amino kiselina, koji se nalazi blizu C-terminusa. Budući da su im tercijerne strukture vrlo slične, vezivanje oba enzima za membrane endoplazmatičnog retikuluma i jedra ostvaruje se amfipatičnim heliksima koji formiraju vezivni centar. Arahidonat se vezuje za enzim u hidrofobnom kanalu, koji se nalazi u blizini vezivnog centra. COX-2 aktivni centar sadrži "bočni džep". Ser<sub>530</sub> ostatak kod COX-1 analogan je Ser<sub>516</sub> kod COX-2 i njegovim acetilovanjem pomoću aspirina dolazi do ireverzibilne inhibicije. Takođe, ostaci Tyr<sub>385</sub> (COX-1) i Tyr<sub>371</sub> (COX-2) imaju

istu funkciju u ciklooksigenaznoj fazi. Aminokiselinska sekvenca potrebna za vezivanje hema (TIWLREHNRV i RGLGF), identična je kod oba izoenzima (Curtis-Prior, 2004.).

COX-1 se nalazi u većini ćelija kao konstitutivni enzim (uvek je prisutan) i smatra se da su prostanoide koje proizvodi uključeni u normalnu homeostazu, kao na primer u regulaciju vaskularnog odgovora i agregaciju trombocita. U bubrezima, prostaglandini nastali dejstvom COX-1 na arahidonsku kiselinu imaju ulogu vazodilatatora koji kontrolišu renalni protok plazme i glomerularnu filtraciju. U želudcu, COX-1 ima protektivnu ulogu tako što PG utiču na protok krvi u mikrocirkulaciji gastične mukoze, štiteći ga na taj način od ishemije, mukozalnog oštećenja i ulceritisa. Naravno, NSAIL (nesteroidni antiinflamatorni lekovi) mogu izazvati ove patološke simptome inhibirajući COX-1 (Marks i Fürstenberg, 1999).

COX-2 se indukuje u inflamatornim ćelijama pod dejstvom inflamatornog agensa. Značajna razlika između COX-1 i COX-2 je i u sposobnosti konverzije endogene, odnosno egzogene arahidonske kiseline. Ispitivanja (Reddy i Herschman, 1994) su pokazala da COX-1 prisutna u fibroblastima i makrofagima može da metaboliše egzogeni arahidonat do  $\text{PGH}_2$ , ali ne može endogeni. Endogena arahidonska kiselina, oslobođena iz membranskih skladišta ligand-stimulišućom aktivacijom fosfolipaze nije dostupna za COX-1, ali jeste za COX-2.

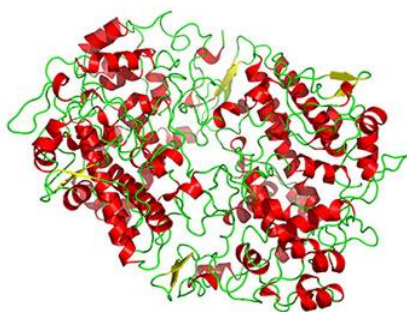
Kada je prvi COX-2 inhibitor NS-398 postao pristupačan, ispitana je njegova sposobnost da inhibira produkciju prostaglandina iz endogene i egzogene arahidonske kiseline. Rezultati su pokazali da NS-398 blokira produkciju  $\text{PGE}_2$  iz endogene arahidonske kiseline, ali nema uticaja na COX-1 zavisno formiranje  $\text{PGE}_2$  iz egzogene arahidonske kiseline (Herschman, 1996). Endogeni arahidonat, oslobođen u odgovoru na stimulaciju ligandom može biti transformisan, u intracelularnim uslovima, u  $\text{PGH}_2$  samo pomoću COX-2, ali ne i COX-1. Takođe, COX-2 je efikasnija pri nižim (ispod 0.5 mM), a COX-1 pri višim (iznad 0.25 mM) koncentracijama arahidonske kiseline (Swinney i sar., 1997). COX-1, za razliku od COX-2, pokazuje pozitivnu kooperaciju sa arahidonskom kiselinom kao supstratom (Swinney i sar., 1997; Chen i sar, 1999). Takođe, Swinney i saradnici (1997) zaključuju da je upravo ova pozitivna kooperacija ključna za objašnjenje nemogućnosti COX-1 da koristi endogenu arahidonsku kiselinu u koncentracijama koje se postižu pri njenom intracelularnom oslobođanju ligand-stimulisanim fosfolipazama. Ovakva podela zadatka, iako ne u potpunosti jasno razgraničena, značajna je za mehanizam dejstva današnjih i budućih NSAIL.

Iako se ova dva enzima razlikuju ne samo u pogledu ekspresije, već su i njihovi geni pozicionirani na različitim hromozomima (humani COX-1 na hromozomu 9, a COX-2 na hromozomu 1), oni ipak, uopšteno, poseduju vrlo sličnu strukturu i imaju istu, dvostruku katalitičku aktivnost. Shodno tome, generalni enzimski mehanizmi koji opisuju aktivnost COX-1 mogu se primeniti i na COX-2.

### 2.3.2.1. COX-1 put metabolizma arahidonske kiseline

Primarna sekvenca COX-1 u potpunosti je određena (Smith i DeWitt, 1996). Utvrđeno je da je COX-1 homodimer sastavljen od dve subjedinice od oko 70 kDa, od kojih svaka sadrži molekul hema koji razdvaja cikloksigenazni i peroksidazni aktivni centar (*Slika 2.19.*). Ova dva dela se nalaze blizu jedan drugom, ali su fizički i funkcionalno razdvojeni. Ovo je potvrđeno reakcijom sa acetilsalicilnom kiselinom, koja acetiluje serinski ostatak i time sprečava ciklooksigenaznu (dioksigenaznu) fazu, ali ne utiče na peroksidaciju (Roth i sar., 1975). Sa druge strane, ako se hem zameni Mg-protoporfirinom, inhibirana je samo peroksidacija (Ogino i sar., 1978).

Svaki monomer sadrži tri strukturalna domena: domen epidermalnog faktora rasta na *N*-terminusu, domen membranskog vezivanja i veliki, globularni katalitički domen sa hidrofobnim kanalom na *C*-terminusu (Smith i sar., 2000).

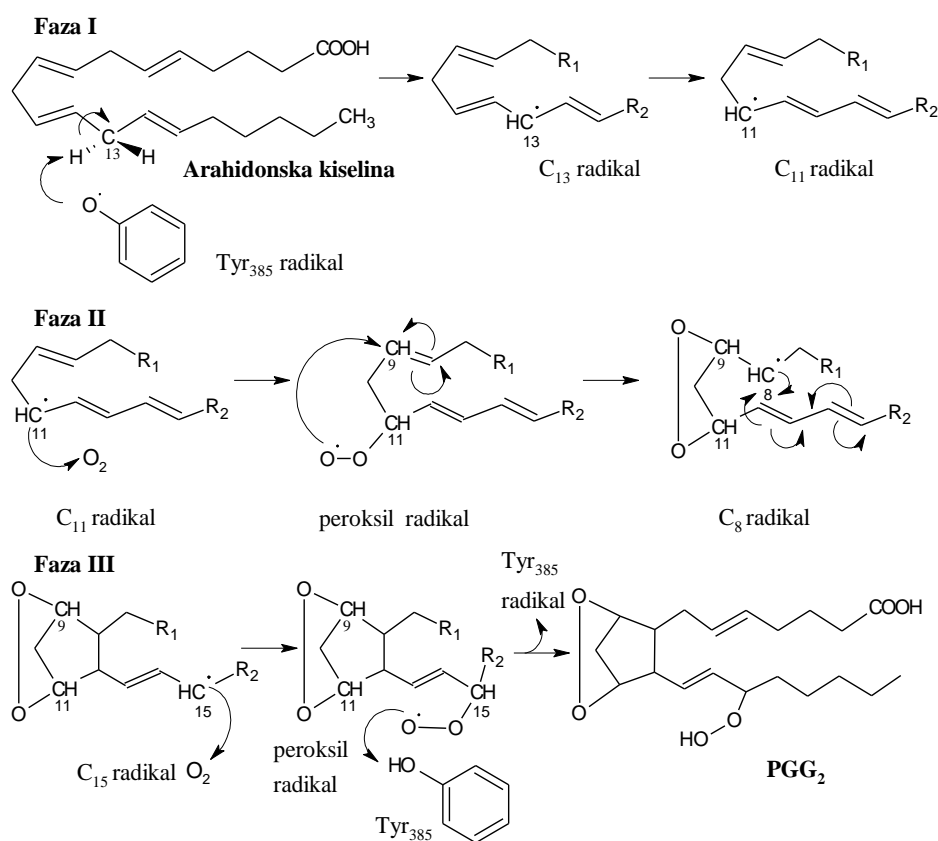


*Slika 2.19.* 3D struktura COX-1  
([www.3dchem.com/molecules.asp?ID=111#](http://www.3dchem.com/molecules.asp?ID=111#))

Postoje jaki dokazi koji potvrđuju hipotezu da ciklooksigenaza vrši oksigenaciju arahidonske kiseline slobodnoradikaliskim mehanizmom. *Site directed mutagenezom* je utvrđeno da enzim u potpunosti gubi svoju aktivnost ukoliko se tirozin u položaju 385, koji se nalazi između hem- i arahidonat-vezujućih mesta, dobro pozicioniran da može da

poveže obe aktivnosti ovog enzima, zameni bilo kojom drugom aminokiselinom, čime je potvrđena njegova centralna uloga u samom procesu katalize. Da bi došlo do stvaranja tirozil radikala neophodno je jako oksidaciono sredstvo, što je u najvećem broju slučajeva prostetična grupa koja sadrži metalni jon. Naime, peroksidazna komponenta učestvuje u aktivaciji gvožđa iz hema prevodeći ga u visokooksidovani oblik. Ovako aktivirano gvožđe ima dovoljan redoks potencijal da izvrši oksidaciju Tyr<sub>385</sub> pri čemu se generiše tirozil radikal.

Oksigenacija arahidonske kiseline se odvija u tri faze (Slika 2.20.).

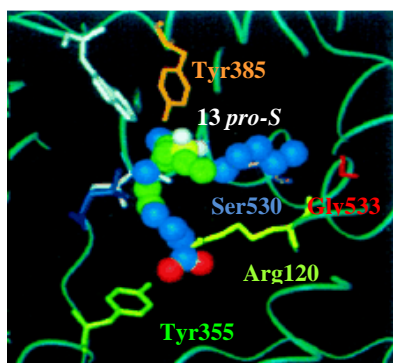


Slika 2.20. Mehanizam oksigenacije arahidonske kiseline  
([www.en.wikipedia.org/wiki/Image:Cyclooxygenase.gif](http://www.en.wikipedia.org/wiki/Image:Cyclooxygenase.gif))

U prvoj fazi tirozil radikal uklanja H<sub>13</sub> pro-*S* atom arahidonske kiseline pri čemu nastaje C<sub>11</sub>-C<sub>15</sub> delokalizovani pentadienil radikal. Nastali C<sub>11</sub> radikal, u drugoj fazi, napada molekul kiseonika uz stvaranje peroksil radikala. Peroksil radikal, dalje, reaguje sa C<sub>9</sub> atomom formirajući cikličnu strukturu - C<sub>8</sub> radikal. Poslednja faza podrazumeva napad formiranog radikala na dvostruku vezu C<sub>12</sub> atoma, pri čemu nastaje biciklični peroksid i novi radikal sa maksimalnom elektronskom gustinom na C<sub>15</sub> atomu. Dalje dolazi do

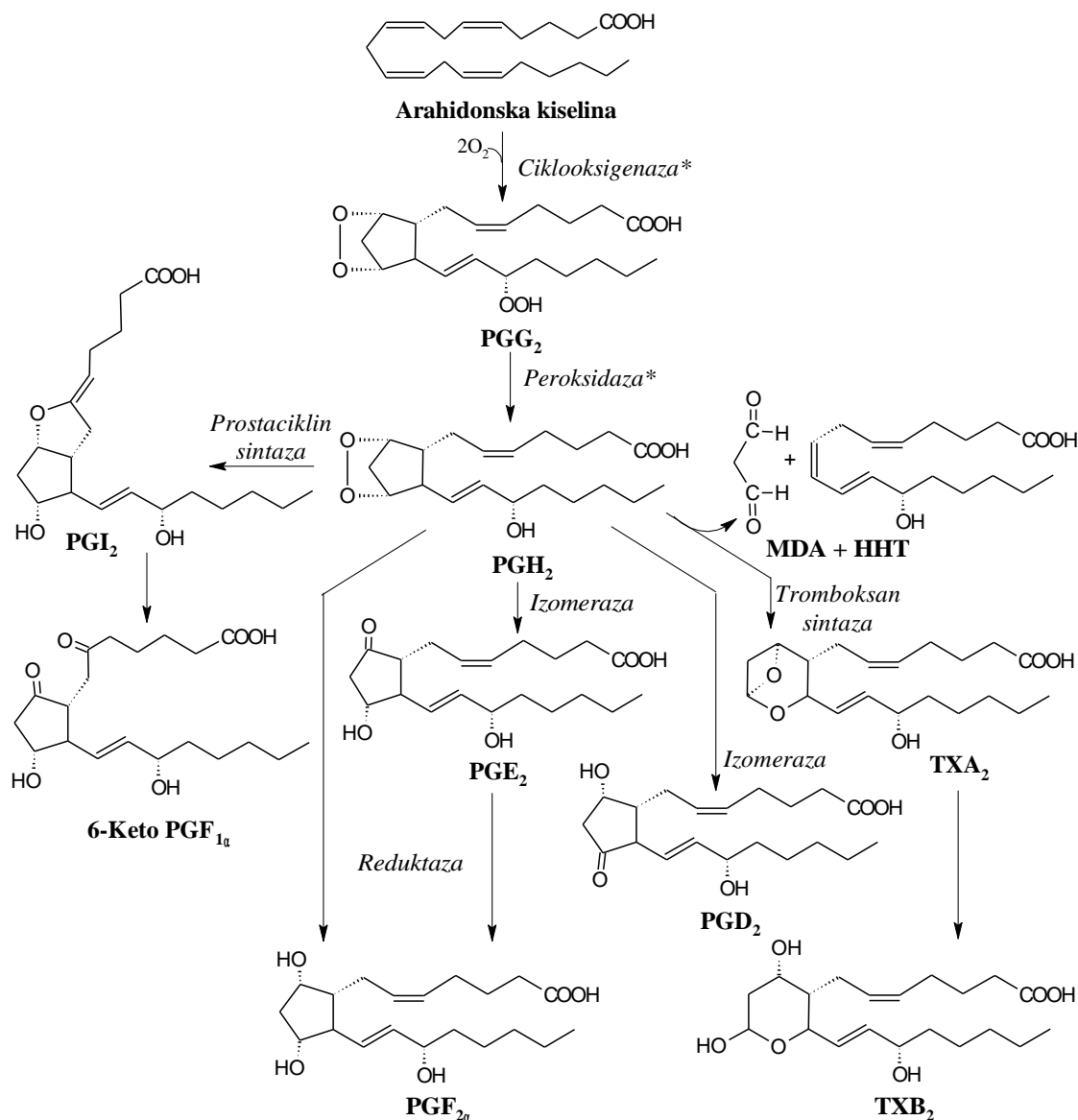
napada na drugi atom kiseonika uz formiranje peroksil radikala koji se redukuje u PGG<sub>2</sub>, pri čemu se Tyr-radikal regeneriše i ponovo ulazi u reakciju (Marnett i sar., 1999). Glavna razlika između COX-katalizovanog procesa i spontane oksidacije arahidonske kiseline, osim povećanja brzine, je i visok stepen stereochemijske kontrole. Naime, tokom enzim-katalizovane reakcije nastaje samo jedan od 64 moguća izomera PGG<sub>2</sub>. Stoga, glavna uloga COX je stereospecifično uklanjanje H<sub>13</sub> *pro-S* atoma i kontrola stereochemije oksigenacije.

Kako bi se postigla stereospecifična kontrola, arahidonska kiselina se specifično vezuje nekovalentnim interakcijama u aktivni centar COX-1 (Slika 2.21.). Najvažniju ulogu u vezivanju supstrata ima pozitivno naelektrisan ostatak Arg<sub>120</sub> koji jonskim interakcijama reaguje sa COO<sup>-</sup> grupom arahidonske kiseline. Ova grupa ostvaruje i vodoničnu vezu sa Tyr<sub>355</sub>, dok ω-kraj arahidonske kiseline reaguje sa α-heliksom katalitičkog domena COX preko ostataka Gly<sub>533</sub> i Ser<sub>530</sub>. Pri ovakvoj konformaciji arahidonske kiseline, Tyr<sub>385</sub> se nalazi u blizini H<sub>13</sub> *pro-S* atoma (Marnett i sar.,1999).



Slika 2.21. Vezivanje arahidonske kiseline u aktivnom centru COX-1  
(Marnett i sar.,1999)

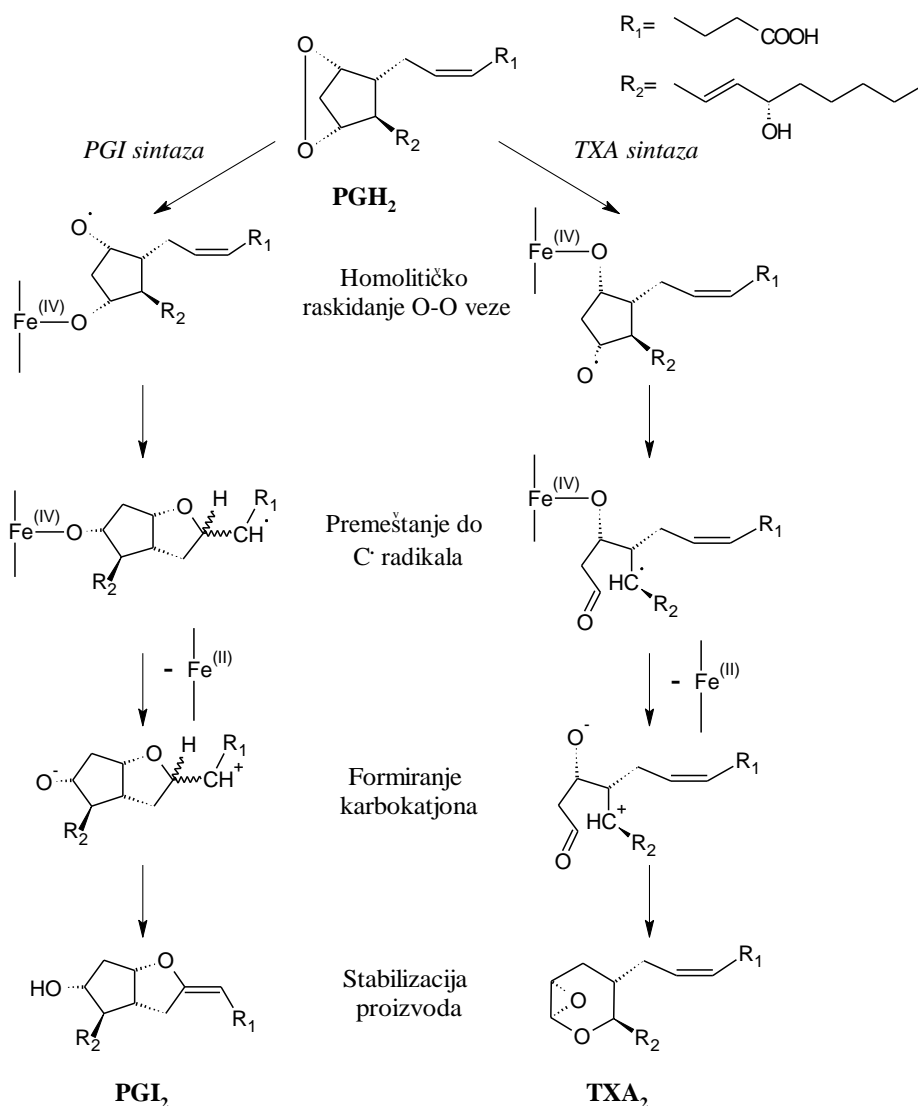
Konverzija PGG<sub>2</sub> u PGH<sub>2</sub> vrši se dvoelektronskom redukcijom posredovanom peroksidazom. U ovom procesu dolazi i do oslobađanja slobodnih radikala, koji ireverzibilno inaktiviraju COX, uspostavljajući na taj način negativnu povratnu spregu koja reguliše sintezu endoperoksida. U završnoj etapi biosinteze iz endoperoksida PGH<sub>2</sub> nastaju različiti produkti u zavisnosti od uslova i tkiva u kome se proces odvija (Slika 2.22.; Mayes i Botham, 2003).



Slika 2.22. Završna faza biosinteze prostaglandina ciklooksigenaznim putem (PG-prostaglandin, PGI-prostaciklin, TX-tromboksan, HHT-hidroksiheptadekatrienoat, MDA-malonildialdehid, \*-aktivnost oba enzima pripisuje se dejstvu prostaglandin H sintaze)

Dalja konverzija **PGH<sub>2</sub>** metabolita odvija se posredstvom različitih enzima (Slika 2.22.). Naime, dejstvo prostaciklin i tromboksan sintaze na **PGH<sub>2</sub>** vodi ka primarnim proizvodima **PGI<sub>2</sub>** i **TXA<sub>2</sub>**, koji podležu neenzimskoj degradaciji pri čemu nastaju neaktivni, stabilni metaboliti 6-keto-PGF<sub>1α</sub> i **TXB<sub>2</sub>** (Hecker i Ullrich, 1989). Budući da ovi enzimi imaju potpuno različite inhibitore i da se dejstvom ova dva enzima dobijaju različiti proizvodi izomerizacije **PGH<sub>2</sub>**, pretpostavlja se da se i da je vezivanje supstrata, **PGH<sub>2</sub>**, drugačije kod oba enzima. Naime, tromboksan sintaza reaguje sa imidazolovim i piridinskim derivatima preko *N-Fe* veze, dok prostaciklin sintaza uspostavlja smole slabe

interakcije sa određenim aminima. Pretpostavljeni mehanizmi nastajanja  $\text{PGI}_2$  i  $\text{TXA}_2$  prikazani su na *Slici 2.23*. (Marks i Fürstenberg, 1999).



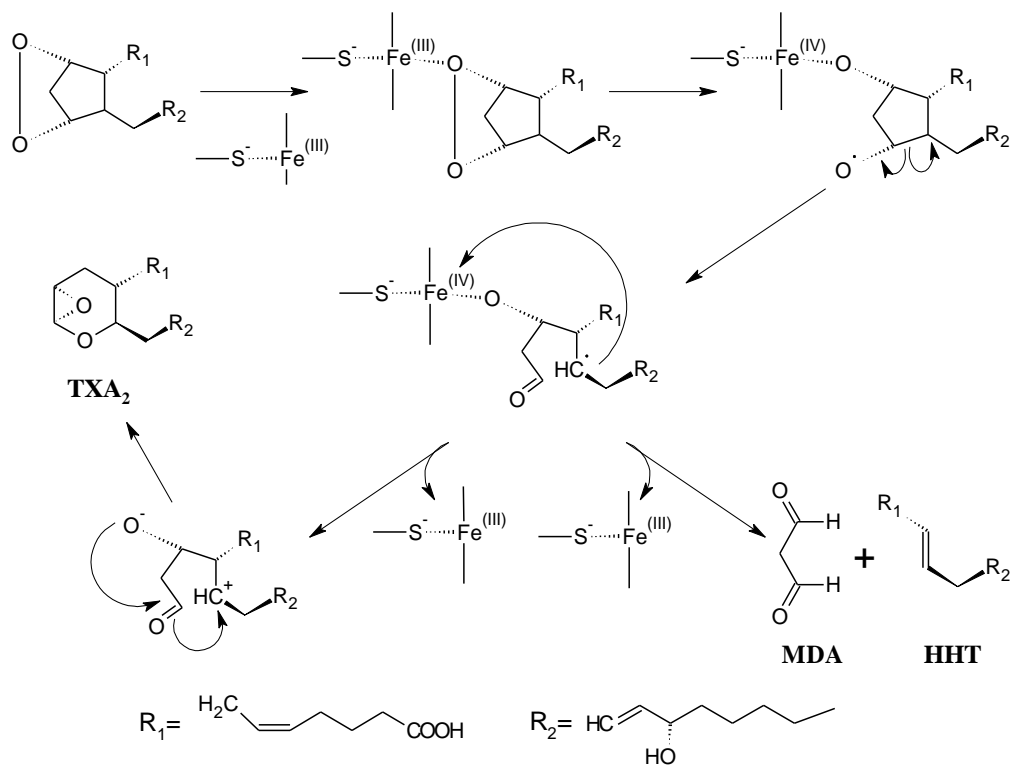
*Slika 2.23.* Pretpostavljeni mehanizam nastajanja  $\text{PGI}_2$  i  $\text{TXA}_2$

Iako su obe reakcije raskidanja endoperoksidne veze katalizovane  $\text{Fe(II)}$  jonom, specifičnost  $\text{PGI}$  sintaze postiže se interakcijom sa kiseonikom na  $\text{C}_{11}$  atomu endoperoksidnog produkta, a tromboksan sintaze sa  $\text{C}_9$  kiseonikom. Homolitičko raskidanje endoperoksidne veze vodi nastajanju alkoksi radikala, koje slede subsekventno premeštanje do karbonil radikala, oksidacija do karbokacija i eliminacija protona (formiranje  $\text{PGI}_2$ ), odnosno jonsko premeštanje (formiranje  $\text{TXA}_2$ ).

Pretpostavlja se da pri formiranju  $\text{PGI}_2$  tioladni ligand enzima ima ključnu ulogu u brzom elektronskom transferu do  $\text{Fe-S}$  centra. Ako se ovaj elektronski transfer odigrava



sporo, onda dolazi do fragmentacije i reakcije nastajanja malondialdehida i 12-HHT, odnosno TXA<sub>2</sub> (Slika 2.24.; Marks i Fürstenberg, 1999). Za određivanje inhibitorne aktivnosti različitih jedinjenja, posebno je značajan 12-HHT proizvod, zbog toga što se praćenjem njegove koncentracije može direktno odrediti COX inhibitorni potencijal, izbegavajući eventualni uticaj antagonista na aktivnost drugih enzima (izomeraza, reduktaza, tromboksan sintaza).



Slika 2.24. Pretpostavljeni mehanizam nastajanja MDA i HHT, odnosno TXA<sub>2</sub>

Drugi mogući putevi transformacije PGH<sub>2</sub> podrazumevaju dejstvo prostaglandin D sintaze, pri čemu se PGH<sub>2</sub> se transformiše do PGD<sub>2</sub> ili prostaglandin E sintaze, kada nastaje PGE. PGF<sub>2α</sub> nastaje direktno iz PGH<sub>2</sub> posredstvom reduktaze ili sukcesivnom izomerizacijom i 9-keto redukcijom nastalog PGE<sub>2</sub>.

Uopšteno, svi primarni PG podležu brzom enzimskoj degradaciji (inaktivaciji) u skoro svim tkivima. Katabolizam prostanoida započinje oksidacijom hidroksilne grupe u položaju 15, pri čemu nastaje 15-okso derivat, koji je deset do sto puta manje aktivan nego njegov prekursor. Postoji više vrsta 15-hidroksiprostaglandin dehidrogenaza specifičnih za različite prostanoidne, a najčešće se nalaze u plućima, bubrezima i placenti. Blokiranje aktivnosti ovog enzima pomoću sulfazina ili indometahina može produžiti vreme

poluživota prostaglandina u telu. Nastali 15-okso produkti zatim bivaju oksidovani (beta ili omega oksidacijom) uglavnom u plućima i jetri, a u izvesnoj meri i u bubrezima. Krajnji produkti, C<sub>16</sub> dikarboksilne kiseline, se ekskretuju urinom (Smith, 1989). Takođe, prestanak delovanja prostaglandina delimično se može postići i putem izvanredne osobine ciklooksigenaze - samokatalizujuće destrukcije, koja ciklooksigenazu čini tzv. „samoubilačkim enzimom“ (Song i sar., 2001).

### **2.3.2.2. Fiziološka dejstva ciklooksigenaznih produkata**

Zbog mogućnosti terapijske primene, klinički najvažniji ciklooksigenazni produkti su primarni prostaglandini serije E i F, prostaciklin (PGI<sub>2</sub>) i tromboksan (TXA<sub>2</sub>). Najjači efekat ispoljavaju na glatke mišiće disajnih puteva, gastrointestinalnog i reproduktivnog sistema, kao i na vaskularnu muskulaturu. Ostale ciljne ćelije su trombociti i monociti, zatim neuroni CNS, ANS i senzorni nervni završeci.

*Prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>)* i njegovi 9-α, 11-β i 11-*epi* izomeri nastaju redukcijom endoperoksida PGH<sub>2</sub> ili PGD<sub>2</sub>. PGF<sub>2α</sub> je potentni vazokonstriktor plućnih arterija i vena. Uticaj na vaskularni tonus i drugu glatku muskulaturu je različit zavisno od regiona. Metaboliti PGF<sub>2α</sub> mogu biti takođe vazokonstriktori i inhibitori agregacije trombocita (Kepes i Kepes, 1969).

*Prostaglandini serije E (PGE<sub>1</sub> i PGE<sub>2</sub>)* imaju široki spektar fiziološkog dejstva. PGE<sub>2</sub> je moćan, ali ne i univerzalan vazodilatator, uglavnom regiona mikrocirkulacije (arteriola, prekapilarnih sfinktera i postkapilarnih venula). Relaksira trahealnu i bronhijalnu muskulaturu. PGE<sub>2</sub> izaziva kontrakciju viscelarne longitudinalne muskulature (urogenitalne i gastrointestinalne) uz istovremenu relaksaciju cirkularnih mišića (sfinktera i cerviksa uteri). Ima značaja u fiziologiji reprodukcije, nalazi se u semenoj tečnosti i pomaže kretanje i nidaciju oplođenog jaja. Visoke koncentracije pred kraj trudnoće značajne su za održavanje uterusnih kontrakcija zajedno sa oksitocinom. I PGE<sub>2</sub> i PGF<sub>2α</sub> mogu se koristiti za izazivanje i stimulaciju porođaja, naročito kod onih žena gde je važno izbeći antidiuretski efekat oksitocina. PGE<sub>2</sub> ima i natriuretski efekat. Zbog snažnog delovanja u smislu izazivanja uterusnih kontrakcija tokom čitave trudnoće, uz istovremeno smekšavanje cerviksa, sintetski PGE<sub>2</sub> preparat (dinoprostone) se koristi za izazivanje abortusa u drugom trimestru trudnoće. Slično dejstvo ima i PGF<sub>2α</sub>, a lokalni način davanja (vaginalete ili intrauterina instilacija) smanjuje neželjene, sistemske efekte na

gastrointestinalni, respiratorni i kardiovaskularni sistem. U većini tkiva, odnosno ćelija  $\text{PGE}_2$  ispoljava svoje dejstvo vezujući se za specifične receptore koji u spoju sa G-proteinom aktiviraju celularni signalni sistem adenilat ciklazu, koja dovodi do porasta koncentracije intracelularnog cAMP što za posledicu ima relaksirajući efekat.  $\text{PGE}_2$  vrši i inhibiciju agregacije trombocita. Prisutan je u većoj koncentraciji u monocitima, a u manjoj meri i u neutrofilima. Na zrele oblike leukocita  $\text{PGE}_2$  deluje pretežno inhibitorno: inhibira proliferaciju T i B limfocita, hemotaks, agregaciju i oksidacioni metabolizam u leukocitima. Takođe, smanjuje i citotoksičnost NK ćelija i inhibira oslobađanje limfokina iz senzibilisanih T-limfocita (Starčević, 1999).

*Tromboksan  $A_2$  ( $\text{TXA}_2$ )* pri normalnim biološkim uslovima ( $\text{pH}=7.4$ ;  $t=37^\circ\text{C}$ ) ima ekstremno kratak poluživot (oko 30s) i metaboliše se neenzimskom hidrolizom u stabilan derivat  $\text{TXB}_2$ .  $\text{TXA}_2$  je jedan od najmoćnijih endogenih vazokonstriktora malih i velikih krvnih sudova, a istovremeno je moćan faktor agregacije trombocita. Pored trombocita, receptori za  $\text{TXA}_2$  i  $\text{PGH}_2$  postoje i na glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova. Vezujući se za G-protein zavisne receptore, tromboksan vrši aktivaciju fosfolipaze C, što dovodi do nastanka DAG i  $\text{IP}_3$ . U citoplazmi ćelije  $\text{IP}_3$  prazni depoe  $\text{Ca}^{2+}$ , što dovodi do povećanja intracelularne koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$ . Kod trombocita se to manifestuje aktivacijom i promocijom agregacije uz još veću produkciju  $\text{TXA}_2$ , a kod glatkih mišića nastaje snažna kontrakcija. Ovim svojim dvostrukim delovanjem u stanjima šoka razne etiologije  $\text{TXA}_2$  produbljuje ishemiju. Primećeno je da davanje specifičnih inhibitora tromboksan sintetaze ne samo da sprečava stvaranje  $\text{TXA}_2$ , već i da usmerava metabolizam arahidonske kiseline ka prostaciklinima. Međutim, farmakološka ispitivanja u cilju pronalaženja visoko selektivnog inhibitora tromboksan sintetaze nisu dala očekivane kliničke benefite, najverovatnije zbog akumulacije prekursora,  $\text{PGH}_2$ , koji ima slična svojstva i deluje preko istih receptora kao i  $\text{TXA}_2$  (Starčević, 1999).

*Prostaglandin  $I_2$  (prostaciklin,  $\text{PGI}_2$ )* je glavni produkt arahidonske kiseline u endotelnim ćelijama i glatkim mišićima krvnih sudova.  $\text{PGI}_2$  je snažan vazodilatatorni prostaglandin, fiziološki agonist  $\text{TXA}_2$  koji smanjuje periferni, pulmonalni i koronarni otpor. Intravenska, kontinuirana infuzija komercijalnog preparata prostaciklina (epoprostenol) je povoljni tretman pulmonalne hipertenzije.  $\text{PGI}_2$  je i najsnažniji poznati endogeni inhibitor aktivacije i agregacije trombocita. Na celularnom nivou prostaciklin deluje preko specifičnih receptora, aktivira adenilat ciklazu i povećava intracelularnu koncentraciju cAMP u endotelnim ćelijama (autokrino). Time indukuje oslobađanje tkivnog aktivatora plazminogena i utiče na održavanje homeostaze. Utvrđeno je da u krvi

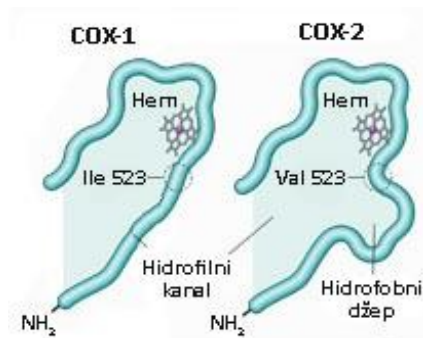
zdravih osoba postoji relativno konstantan odnos koncentracije prostaciklina i tromboksana,  $\text{PGI}_2:\text{TXA}_2 = 2,5:1$ . Poremećaj ovog odnosa igra važnu ulogu u patogenezi tromboembolijskih i ishemičnih kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih oboljenja. Ispitivanja na humanim fibroblastima pokazala su da se sa starenjem smanjuje stvaranje  $\text{PGI}_2$ , dok se sinteza  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  i  $\text{TXA}_2$  relativno povećava. Biosinteza tromboksana i prostaciklina, u fiziološkim uslovima je vrlo izbalansirana, tako da je ravnoteža u ovom delu eikosanoidnog sistema od velike važnosti za homeostazu periferne cirkulacije i kardiopulmonalnog sistema (Starčević, 1999).

### **2.3.2.3. Inhibitori ciklooksigenaze**

Dve najveće grupe antiinflamatornih inhibitora obuhvataju glikokortikoide, klasu steroidnih jedinjenja i nesteroidne antiinflamatorne lekove (NSAIL). Glikokortikoidi se koriste za supresiju različitih alergijskih, inflamatornih i autoimunih poremećaja. U pogledu antiinflamatornog dejstva, oni sprečavaju različite leukocitne procese (epitelnu adheziju, migraciju, fagocitozu i sl.), kao i sintezu glavnih produkata inflamacije, prostaglandina i leukotriena, odnosno inhibiraju dejstvo ciklooksigenaze. Takođe, glikokortikoidi imaju izuzetno važnu terapijsku primenu u lečenju astme i kao imunosupresanti pri transplantaciji organa. Međutim, većina glikokortikoida koji se primenjuju nisu selektivni, tako da dužom upotrebom mogu da izazovu niz neželjenih anboličkih procesa. Sa druge strane, NSAIL mogu da ispoljavaju tri glavne vrste efekata: antiinflamatorne (modifikacija inflamatorne reakcije), analgetičke (ublažavanje izvesnih vrsta bolova) i antipiretičke efekte (sniženje povišene telesne temperature). Poznato je da je antiinflamatorno dejstvo NSAIL uglavnom u vezi sa inhibicijom COX-2, dok su njihovi neželjeni efekti, a posebno oni koji se odnose na gastrointestinalni trakt, velikim delom posledica inhibicije COX-1. Većina tradicionalnih NSAIL koji se danas primenjuju inhibiraju oba COX izoenzima, iako se međusobno razlikuju prema stepenu njihove inhibicije (Rang i sar., 2004).

Kako je činjenica da inhibicija sinteze prostaglandina ima antiinflamatorni efekat bila poznata pre otkrića različitih izoformi COX enzima, prvi lekovi sa ovim dejstvom, nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL), bili su nespecifični inhibitori i COX-1 i COX-2 izoforme. X-ray kristalografija 3D-strukture COX-1 i COX-2 uveliko je odredila u kom smeru će ići sinteza novih, selektivnih inhibitora COX-2.

COX-1 i COX-2 su strukturno veoma slični enzimi koji sadrže dugačak, uzan kanal sa strukturom ukosnice na svom hidrofobnom kraju preko kojeg su vezani za membranu (Hawkey, 1999). Arahidonska kiselina oslobođena iz membrane se uvlači kroz ovaj hidrofobni kanal i smešta se u aktivni centar enzima. Međutim, na mehanizam selektivnog delovanja NSAIL utiče nekoliko ključnih razlika u strukturi COX-1 i -2. Naime, X-ray kristalografija pokazuje da se blokiranje COX-1 postiže na sredini hidrofobnog kanala, formiranjem vodonične veze između polarnog arginina u položaju 120 i NSAIL, ali da je Arg<sub>120</sub> takođe prisutan i kod COX-2. Takođe, X-ray kristalografijom i *site directed mutagenezom* je pokazano da se aktivni centri postojećih izoformi ciklooksigenaze razlikuju u jednoj jedinoj aminokiselini: u položaju 523 kod COX-1 se nalazi Ile, a kod COX-2 se nalazi Val. Nedostatak samo jedne metil grupe kod COX-2 uslovljava nastanak hidrofobnog džepa u zidu hidrofobnog kanala koji predstavlja mesto vezivanja mnogih selektivnih lekova (Slika 2.25.).

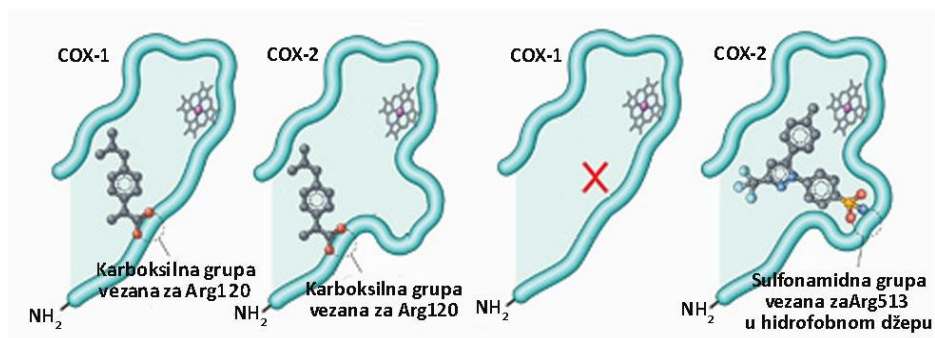


Slika 2.25. Hidrofobni kanali u aktivnom centru COX-1 i COX-2  
([www.netterimages.com/image/11131.htm](http://www.netterimages.com/image/11131.htm))

Dakle, na osnovu selektivnosti inhibicije, NSAIL, se dele u dve osnovne grupe:

- *klasični neselektivni NSAIL* (aspirin, ibuprofen, diklofenak) i
- *selektivni NSAIL inhibitori COX-2* (celecoxib, rofecoxib).

Ove dve grupe inhibitora se razlikuju po mestu vezivanja u aktivnom centru enzima (Slika 2.26.).



Slika 2.26. Delovanje neselektivnih i selektivnih NSAIL na COX-1 i COX-2  
([www.netterimages.com/image/11131.htm](http://www.netterimages.com/image/11131.htm))

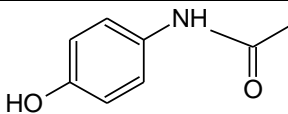
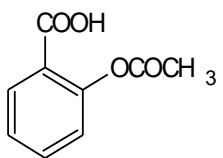
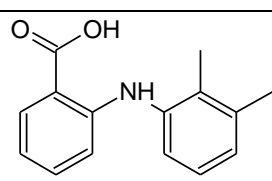
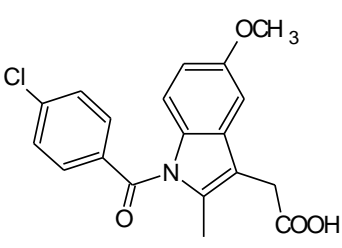
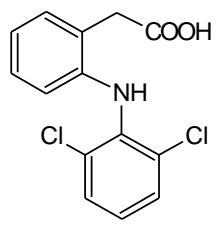
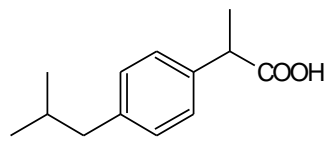
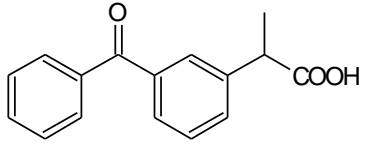
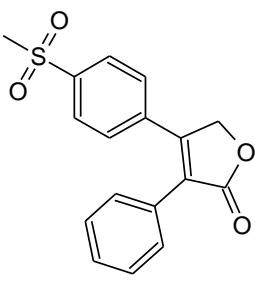
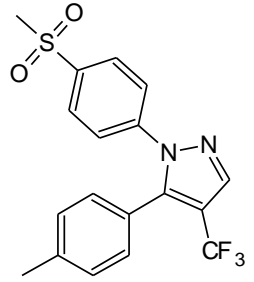
Neselektivni inhibitori COX se vezuju na ulazu u aktivni centar, blokirajući pristup arahidonskoj kiselinu. Selektivni inhibitori COX-2 se vezuju u hidrofobnom džepu na polovini aktivnog centra, što je zbog prisustva aminokiseline Ile nemoguće kod COX-1 izoforme.

Sa druge strane, prema mehanizmu delovanja NSAIL se dele na tri klase:

- *jednostavni kompetitivni inhibitori*: intereaguju brzo i reverzibilno sa aktivnim mestom ciklooksigenaze formirajući enzim-inhibitor kompleks (EI); predstavnici su ibuprofen, naproksen, piroksikam i sulindak
- *kompetitivni, vremenski zavisni inhibitori*: njihova reakcija sa aktivnim mestima COX je sporija u odnosu na jednostavne kompetitivne inhibitore. Nakon formiranja EI kompleksa, inhibitor izaziva sporu, reverzibilnu konformacionu promenu enzima pri čemu nastaje EI\* kompleks. Ovaj nekovalentni, relativno stabilan kompleks sporije disocira od EI kompleksa. Predstavnici ove grupe su diklofenak, flubiprofen, indometacin i meklofenamat
- *ireverzibilni, vremenski zavisni inhibitori*: trajno blokiraju delovanje enzima, kovalentno ga modifikujući, npr. aspirin  
([www.emedicine.com/med/TOPIC3096.HTM](http://www.emedicine.com/med/TOPIC3096.HTM))

Prema hemijskoj strukturi NSAIL se mogu podeliti u nekoliko grupa, a strukture njihovih predstavnika prikazane su u *Tabeli 2.4*.

Tabela 2.4. Podela NSAIL prema hemijskoj strukturi

Klasa jedinjenja	Predstavnici
Derivati anilina	 Paracetamol
Derivati salicilne kiseline	 Acetilsalicilna kiselina (Aspirin)
Derivati antranilne kiseline	 Mefenaminska kiselina
Derivati indolsirćetne kiseline	 Indometacin
Derivati fenilsirćetne kiseline	 Diklofenak
Derivati propionske kiseline	 Ibuprofen  Ketoprofen
Dervati sulfona i sulfonamida - selektivni inhibitori COX-2	 Rofekoksib  Celekoksib

Pored sintetskih NSAIL, postoji i niz prirodnih proizvoda (kurkumin, omega-3-masne kiseline, resveratrol, flavonoidi, neksrutin) koji mogu da inhibiraju ciklooksigenaznu aktivnost i na taj način učestvuju u supresiji inflamacije.

*Kurkumin* je jedan od sastojaka biljke *Curcuma longa*. Iako je poznat kao začini, mnoge kliničke studije pokazuju da je kurkumin i antiinflamatorno i analgetično sredstvo. Ispitivanja su pokazala da kurkumin pokazuje direktno inhibitorno delovanje na COX-2 *in vitro*. Smatra se da bi kurkumin mogao biti koristan za tretman stalnih upalnih promena kao što su Kronova bolest ili ulcerativni kolitis (Zhang i sar., 1999).

*Omega-3 masne kiseline*,  $\alpha$ -linolenska kiselina (ALA), eikozapentaen-kiselina (EPA) i dokozaheksaen-kiselina (DHA), uticale su na smanjenje aktivnosti COX-2 srazmerno njihovoj količini, dok je aktivnost COX-1 ostala nepromenjena, kod ćelija tretiranih interleukinom IL-1, koji je jedan od najvažnijih stimulatora COX-2. Ostale masne kiseline (palmitinska, linolna ( $\omega$ -6) i oleinska ( $\omega$ -9)) nisu pokazale delovanje na COX-2. Dobijeni rezultati ukazuju da  $\omega$ -3 masne kiseline mogu selektivno delovati na aktivnost COX-2 što otvara mogućnost još jedne njihove primene u farmakološkoj industriji (Curtis i sar., 2000).

*Resveratrol* je fitohemikalija koja se dobija iz kožice grožđa, a njena antiinflamatorna aktivnost prvi put je opisana 1997. godine, kada je utvrđeno da smanjuje aktivnost COX-2 (Jang, 1997). Dalja ispitivanja sa resveratrolom potvrdila su inhibitorno delovanje na COX-2 bez delovanja na COX-1 (Jang i Pezzuto, 1998).

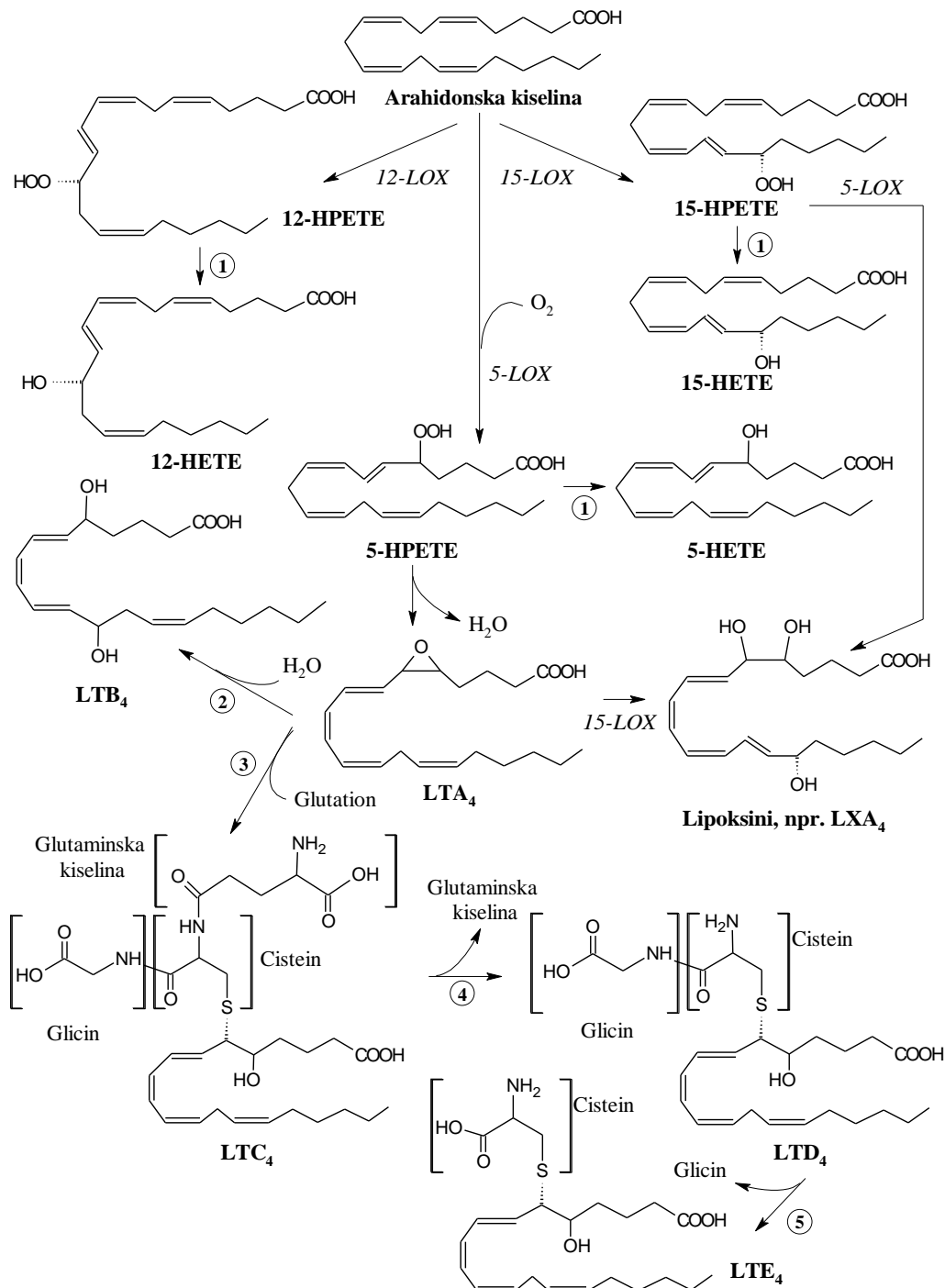
*Flavonoidi* su bili predmet ispitivanja grupe japanskih naučnika koji su 1998. godine testirali 14 prirodnih supstanci, pri čemu je samo četiri pokazalo značajno, dozno-zavisno, inhibitorno delovanje na COX-2. Genistein, kampferol, kvercetin i rezorcinol su pokazali delovanje, s time da je kvercetin pokazao najveću aktivnost. Supstance koje su pokazale COX-2 inhibitornu aktivnost imaju jedinstvenu rezorcinolsku strukturu (Mutoh i sar., 2000).

*Neksrutin* je prirodni inhibitor COX-2. Dobija se iz biljke *Phellodendron amurense* i istraživanja pokazuju da je delotvoran u tretmanu upalnih bolesti. Ova se biljka vekovima upotrebljavala u kineskoj medicini za lečenje gastroenteritisa, abdominalnih bolova i diareje. Neksrutin zapravo deluje na gen odgovoran za nastanak COX-2, usled čega olakšava bolove u zglobovima i mišićima i čini lakšim svakodnevne aktivnosti ([www.nextpharmaceuticals.com](http://www.nextpharmaceuticals.com)).



### 2.3.3. Lipooksigenazni putevi metabolizma arahidonske kiseline

Na *Slici 2.27.* prikazana je šema nastajanja glavnih lipooksigenaznih metabolita (Mayes i Botham, 2003).

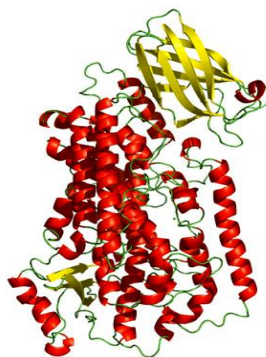


*Slika 2.27.* Konverzija arahidonske kiseline do leukotriena i lipoksina *serije 4* (HETE-hidroksieikozatetraenoat, HPETE-hidroperoksieikozatetraenoat, LOX-lipooksigenaza, LT-leukotrien; **1**-peroksidaza, **2**-leukotrien A<sub>4</sub> epoksid hidrolaza, **3**-glutathion S-transferaza, **4**- $\gamma$ -glutamiltanspeptidaza, **5**-cisteinil-glicin dipeptidaza)

Lipooksigenazni put metabolizma arahidonske kiseline dovodi do biosinteze velikog broja produkata koji su odgovorni za nastajanje mnogih alergijskih reakcija, autoimunih oboljenja i inflamacija. Postoji više lipooksigenaza koje učestvuju u metabolizmu arahidonske kiseline, od kojih svaka nosi naziv *n*-lipooksigenaza, gde *n* predstavlja broj C atoma koji se oksiduje tj. na koji će se adirati molekul kiseonika (Curtis-Prior, 2004). Svaka od lipooksigenaza je prvi enzim u metaboličkom putu arahidonske kiseline koji kao krajnji proizvod ima različite eikozanoide. Lipooksigenaze koje su najčešće tema naučnih ispitivanja su 5-, 12- i 15-lipooksigenaza.

### 2.3.3.1. 5-Lipooksigenazni put metabolizma arahidonske kiseline

5-Lipooksigenaza (5-LOX) je glavni enzim u biosintezi leukotriena (LT) i igra važnu ulogu u patofiziologiji nastajanja alergija i inflamacije. 5-LOX (Slika 2.28.) je metaloenzim koji u aktivnom centru ima jon gvožđa. U aktivnom stanju enzima jon gvožđa se nalazi u obliku  $\text{Fe}^{3+}$ , a u neaktivnom stanju u obliku  $\text{Fe}^{2+}$ . Jon gvožđa je koordinovan sa četiri histidinska ostatka (Curtis-Prior, 2004).



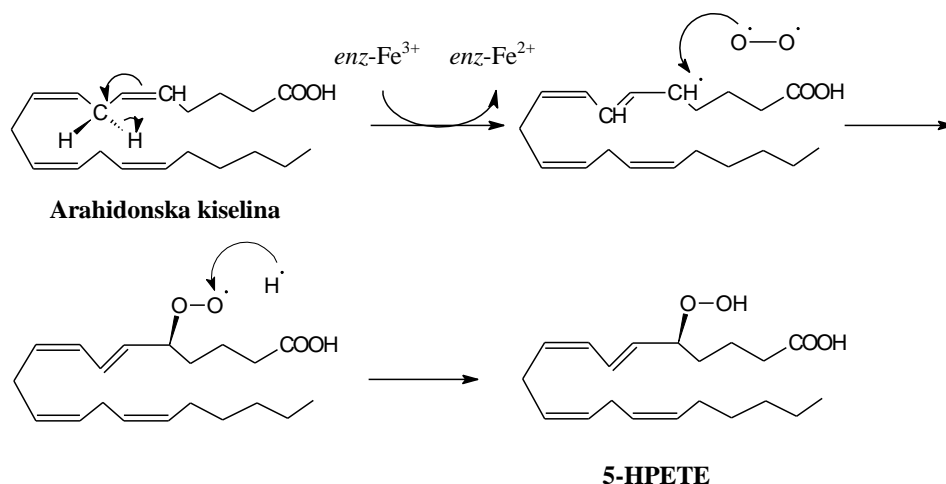
Slika 2.28. 3D struktura 5-LOX  
([www.gecco.org.chemie.uni-frankfurt.de/research.html](http://www.gecco.org.chemie.uni-frankfurt.de/research.html))

Dokazano je da su  $\text{Ca}^{2+}$  joni kao i ATP neophodni za aktivaciju 5-LOX (Bigby, 2002), a da se sinteza leukotriena odvija u citoplazmi, tačnije na jedrovoj membrani (Woods i sar., 1993). Nakon fosforilacije ostatka  $\text{Ser}_{271}$  katalizovane kinazom dolazi do translokacije 5-LOX sa periferije citoplazme do jedrove membrane. Da bi došlo do početka sinteze leukotriena neophodna je arahidonska kiselina koja se oslobađa iz ćelijske membrane i transportuje do jedrove membrane pomoću fosfolipaze  $\text{A}_2$ . Arahidonska kiselina se pomoću FLAP-a (protein koji aktivira 5-LOX, *five lipoxygenase activating*

*protein*) dovodi do 5-LOX, nakon čega dolazi do prve reakcije sinteze LT uz pomoć 5-LOX (Bigby, 2002).

5-LOX katalizuje dve reakcije (Slika 2.27.) i to nastanak 5-hidroperoksieikosatetraen-kiseline (5-HPETE) i nastanak leukotriena A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>).

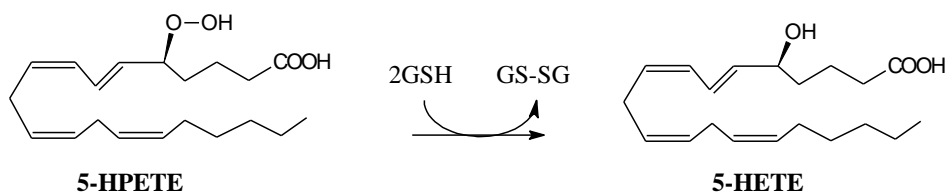
Reakcija nastajanja 5-HPETE prikazana je na Slici 2.29. (Curtis-Prior, 2004).



Slika 2.29. Rekcija transformacije arahidonske kiseline do 5-HPETE

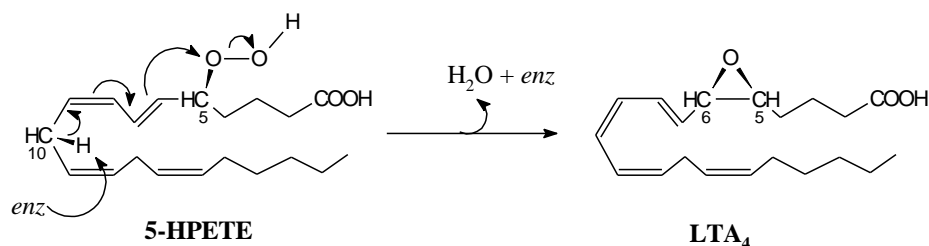
Prva faza reakcije nastajanja 5-HPETE je 5-LOX stereospecifična oksigenacija arahidonske kiseline. Do reakcije dolazi tako što enzim prvo apstrahuje *pro-S* vodonikov atom sa C<sub>7</sub> atoma arahidonske kiseline, pri čemu dolazi do redukcije Fe<sup>3+</sup> u Fe<sup>2+</sup>, a zatim vrši adiciju O<sub>2</sub> molekula na C<sub>5</sub> položaj, pri čemu nastaje 5-HPETE.

Nakon nastajanja 5-HPETE reakcija može da se nastavi u smeru biosinteze 5-hidroksieikosatetraen-kiseline (5-HETE). Ovu reakciju katalizuje enzim glutation peroksidaza i šematski je pikazana na Slici 2.30.



Slika 2.30. Rekcija transformacije 5-HPETE do 5-HETE

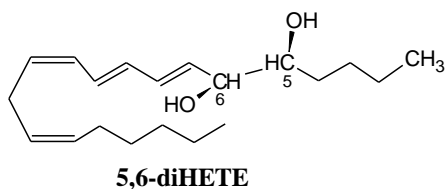
Druga reakcija 5-LOX predstavlja formiranje 5,6-epoksida uz otpuštanje molekula vode. (Slika 2.31.).

Slika 2.31. Mehanizam nastajanja LTA<sub>4</sub> uz pomoć 5-LOX

Ova reakcija 5-LOX se često, iako netačno, navodi i kao reakcija LTA<sub>4</sub> sintetaze. Reakcija počinje antrafacijalnim nukleofilnim napadom na C<sub>10</sub> atom 5-HPETE, pri čemu dolazi do uklanjanja *pro-R* vodonika. Potom dolazi do kaskadnog premeštanja dvostruke veze i do formiranja 5,6-epoksida. Na kraju se oslobađa molekul vode i nastaje izuzetno nestabilan LTA<sub>4</sub> (Curtis-Prior, 2004).

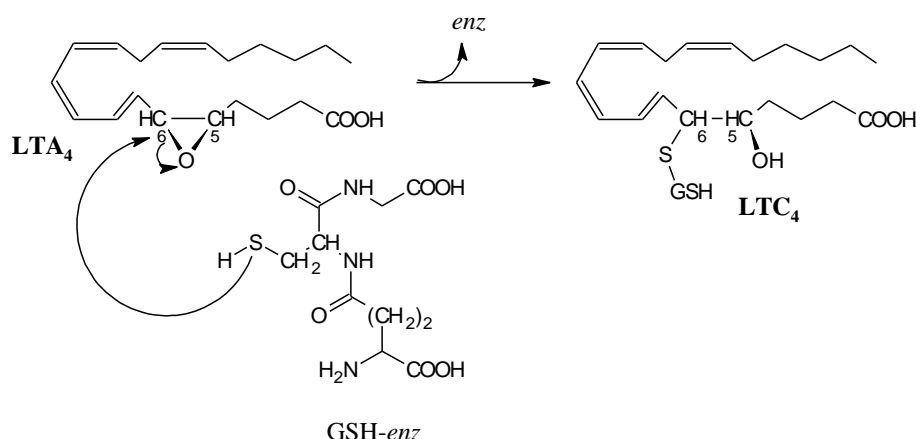
LTA<sub>4</sub> može dalje da se transformiše na tri načina i to neenzimskom i enzimskom hidrolizom, kao i reakcijom LTC<sub>4</sub> sintetaze.

Neenzimskom hidrolizom nastaje nekoliko bioneaktivnih produkata, kao što su 5,12- i 5,6-dihidroksieikosatetraen-kiselina (5,12- i 5,6-diHETE). Na Slici 2.32. prikazana je struktura 5,6-diHETE.

Slika 2.32. Produkt neenzimske hidrolize LTA<sub>4</sub>

Enzimskom hidrolizom sa LTA<sub>4</sub> hidrolazom nastaje biološki aktivan leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>). Ovaj enzim katalizuje stereohemijsku adiciju molekula vode na LTA<sub>4</sub>. Ključnu ulogu u aktivnosti ovog enzima igra jon Zn<sup>2+</sup> (Thunnissen i sar., 2001). LTA<sub>4</sub> hidrolaza je jedini enzim sintetskog puta leukotriena koji se ne nalazi na jedrovoj membrane.

Reakcijom LTC<sub>4</sub> sintetaze nastaju biološki aktivni leukotrieni C<sub>4</sub>, E<sub>4</sub> i D<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> i LTD<sub>4</sub>). Ovi leukotrieni se nazivaju cistenil-leukotrieni ili peptidoleukotrieni, jer u svojoj strukturi sadrže molekul cisteina. LTC<sub>4</sub> sintetaza koja se, kao i većina enzima koji učestvuju u sintezi leukotriena, nalazi na jedarnoj membrani, omogućuje adiciju molekula glutaciona na C<sub>6</sub> atom LTA<sub>4</sub> pri čemu nastaje LTC<sub>4</sub> (Hammarström, 1983). Mehanizam nastanka LTC<sub>4</sub> prikazan je na Slici 2.33.



Slika 2.33. Mehanizam nastajanja LTC<sub>4</sub> uz pomoć enzima LTC<sub>4</sub>-sintetaze

LTD<sub>4</sub> nastaje iz LTC<sub>4</sub> u reakciji katalizovanoj enzimom  $\gamma$ -glutamil transpeptidaza, gde je adicija molekula vode na LTC<sub>4</sub> praćena otpuštanjem  $\gamma$ -glutamata. LTE<sub>4</sub> nastaje otpuštanjem molekula glicina iz LTD<sub>4</sub> pod dejstvom cistenil-glicin-dipeptidaze (Slika 2.27.).

LT se sintetišu u mnogim ćelijama, a najviše u leukocitima. U Tabeli 2.5. prikazane su vrste LT i odgovarajućih LT receptora koji su karakteristični za određeni tip ćelije. Relativni kapacitet sinteze leukocita je označen znakom (+), a znak (-) se odnosi na sintezu leukocita koja je zanemarljiva. Ekspresija receptora je klasifikovana kao pozitivna (+), negativna (-), minimalna ( $\pm$ ) i neodređena (nd), (Peters-Golden i Henderson, 2007).

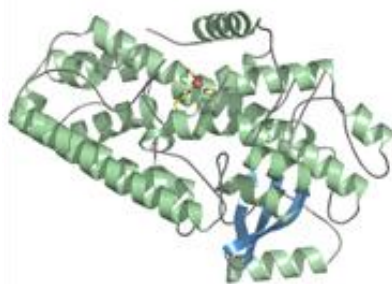
Tabela 2.5. Sinteze leukotriena i ekspresija receptora u različitim tipovima ćelija

Tip ćelije	Tip LT		LT receptori			
	LTB <sub>4</sub>	Cistein LT	BLT <sub>1</sub>	BLT <sub>2</sub>	CysLT <sub>1</sub>	CysLT <sub>2</sub>
Neutrofili	+++	-	+	+	$\pm$	$\pm$
Makrofage	++	++	+	+	+	+
Eozinofili	-	+++	+	+	+	+
Bazofili	-	+++	+	-	+	+
Mastociti	+	+++	+	+	+	+
B limfociti	-	-	nd	+	+	nd
T limfociti	-	-	+	+	+	nd
Dendriti	-	-	nd	+	+	nd

Sinteza LT je veoma specifična jer se vrši po principu „transcelularne biosinteze“. Transcelularna biosinteza je kooperativan proces među različitim vrstama ćelija, pri kom se sinteza određenog molekula vrši u različitim vrstama ćelijama. Do transcelularne biosinteze dolazi jer nemaju sve ćelije svaki enzim koji je potreban za sintezu određenog molekula. Zbog toga u toku biosinteze produkti metabolizma migriraju iz jedne vrste ćelija u drugu, u zavisnosti od enzima potrebnog za sledeći korak metabolizma. Dobar primer za to je sinteza LTC<sub>4</sub> koja započinje stimulacijom neutrofila. Neutrofili, u ovom slučaju ćelije donori, poseduju 5-LOX i FLAP i metabolišu arahidonsku kiselinu do LTA<sub>4</sub>. Nakon toga epitelne ćelije, u ovom slučaju akceptorske ćelije, koje nemaju 5-LOX primaju LTA<sub>4</sub> od neutrofila i u njima se nastavlja metabolizam arahidonske kiseline do LTC<sub>4</sub>. Iako neutrofili nemaju LTC<sub>4</sub>-sintetazu, a endotelne ćelije 5-LOX i FLAP, metabolizam arahidonske kiseline je ipak moguć uz pomoć fenomena transcelularne biosinteze (Folco i Murphy, 2006).

### 2.3.3.2. 12-Lipooksigenazni put metabolizma arahidonske kiseline

Postoje tri tipa 12-lipooksigenaza (12-LOX): leukocitna, trombocitna (*Slika 2.34.*) i epidermalna. Tipovi 12-LOX se razlikuju kako po lokaciji tako i po stereochemiji reakcije koju katalizuju. Trombocitna i leukocitna 12-LOX vode ka nastanku 12(*S*)-proizvoda, dok epidermalna ka 12(*R*)-proizvodu.

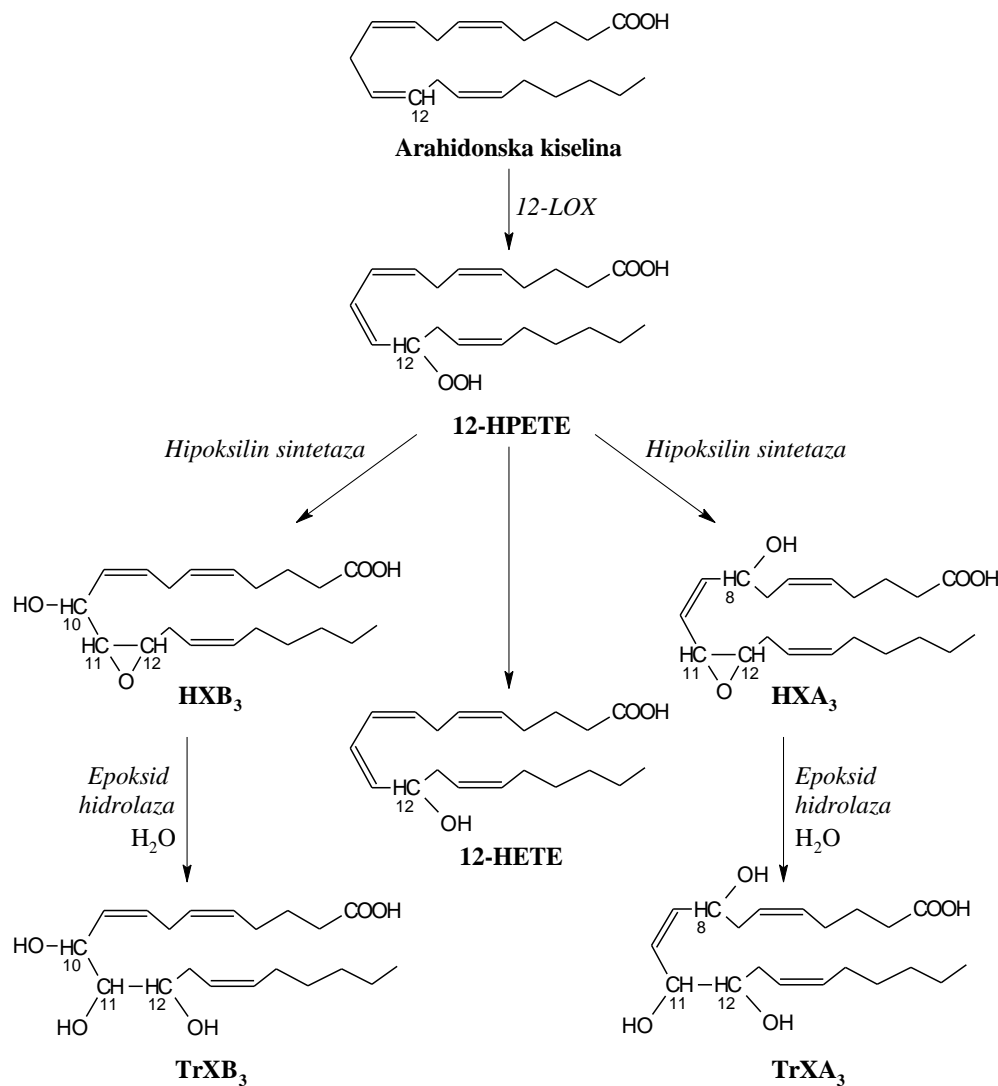


*Slika 2.34.* 3D struktura humane, trombocitne 12-LOX  
([www.sgc.ki.se/structures.html](http://www.sgc.ki.se/structures.html))

Pri metabolizmu arahidonske kiseline koji katalizuje 12-LOX (*Slika 2.35.*) nastaju različiti bioaktivni molekuli: 12-hidroperoksieikosatetraen-kiselina (12-HPETE), 12-hidroeikosatetraen-kiselina (12-HETE), hipoksilin A<sub>3</sub> i B<sub>3</sub> (HXA<sub>3</sub>, HXB<sub>3</sub>) i trioksilin A<sub>3</sub> i B<sub>3</sub> (TrXA<sub>3</sub>, TrXB<sub>3</sub>). Mehanizam delovanja svih lipooksigenaza je veoma sličan, razlikuje se samo po broju ugljenikovog atoma na kom se odigrava reakcija. Slično nastajanju 5-

HPETE proizvoda dejstvom 5-LOX (Slika 2.29.), prva reakcija 12-LOX, trombocitne i leukocitne, je stereospecifična apstrakcija *pro-S* vodonikovog atoma sa  $C_{10}$  položaja arahidonske kiseline, pri čemu dolazi, kao i kod svih lipooksigenaza, do redukcije  $Fe^{3+}$  u  $Fe^{2+}$ . Sledeći korak je adicija  $O_2$  molekula na  $C_{12}$  položaj i dobijanje 12-HPETE. Trombocitna 12-LOX dalje katalizuje biosintezu 12-HETE, dok leukocitni tip 12-LOX pored 12-HETE može da katalizuje i reakciju nastajanja 15-HETE. Praćenje i kvantifikacija 12-HETE metabolita je najčešće korišćena eksperimentalna metoda za određivanje 12-LOX inhibitorne aktivnosti različitih jedinjenja.

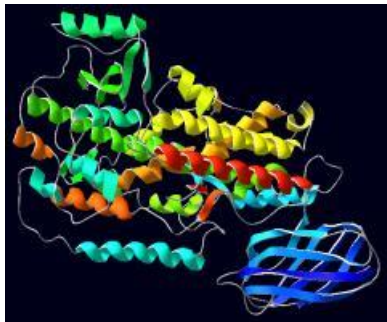
HXA<sub>3</sub> i HXB<sub>3</sub>, proizvodi hipoksilin sintetaze, prevode se pod uticajem epoksid hidrolaze u krajnje proizvode TrXA<sub>3</sub> i TrXB<sub>3</sub> (Slika 2.35.; Marks i Fürstenberg, 1999)



Slika 2.35. 12-Lipooksigenazni put metabolizma arahidonske kiseline

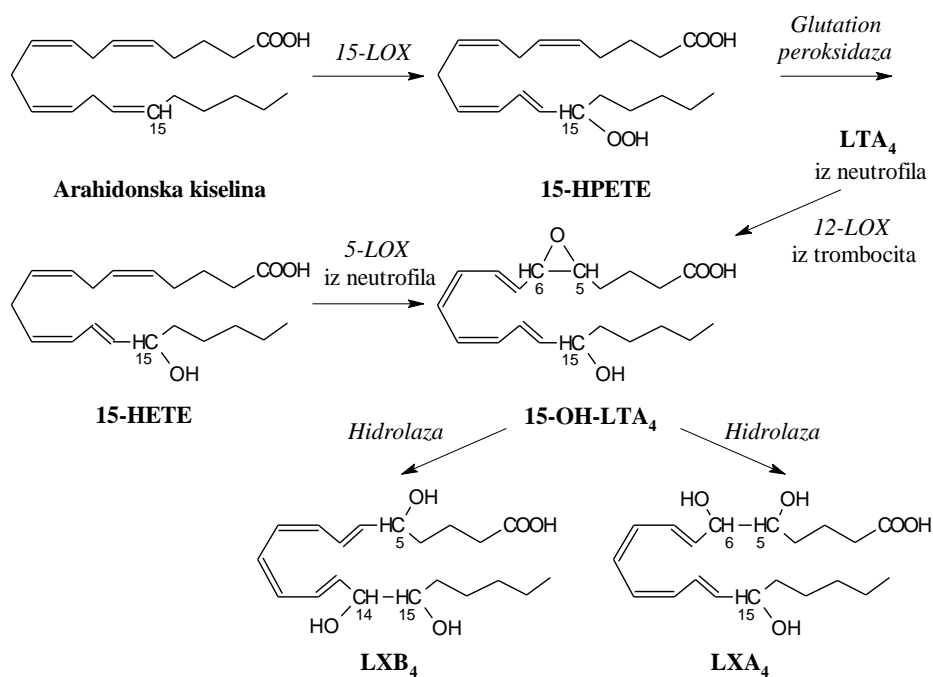
### 2.3.3.3. 15-Lipooksigenazni put metabolizma arahidonske kiseline

3D model 15-lipooksigenaze prikazan je na *Slici 2.36*.



*Slika 2.36.* 3D struktura 15-lipooksigenaze  
([www.dkfz.de/spec/lox-db/images/rb15-lox.jpg](http://www.dkfz.de/spec/lox-db/images/rb15-lox.jpg))

Kao i kod svih lipooksigenazom katalizovanih biosinteza, i ovde je prva reakcija stereospecifična apstrakcija *pro-S* vodonika, ali sa položaja  $C_{13}$  arahidonske kiseline (*Slika 2.29.*). Sledeća reakcija je adicija  $O_2$  molekula na  $C_{15}$  položaj, pri čemu nastaje 15-hidroperoksieikosatetraen-kiselina (15-HPETE). Dalji metabolizam 15-HPETE može ići u više smerova od kojih je najzanimljivije nastajanje lipoksina (LX) transcelularnom biosintezom (Curtis-Prior, 2004). Na *Slici 2.37.* prikazane su faze nastajanja lipoksina  $LXA_4$  i  $LXB_4$ .



*Slika 2.37.* Dva moguća puta nastanka lipoksina transcelularnom biosintezom



Prvi biosintetski put obuhvata nastanak 15-hidroeikosatetraen-kiseline (15-HETE) uz pomoć 15-LOX u bilo kojoj ćeliji koja ima 15-LOX, npr. epitelna ćelija, i dalju transformaciju 15-HETE u neutrofilima do nastanka lipoksina. Drugi put sinteze lipoksina počinje u neutrofilima, gde  $LTA_4$  napušta ćeliju neutrofila, ulazi u trombocite i uz pomoć 12-LOX i odgovarajućih hidrolaza transformiše u lipoksine (Folco i Murphy, 2006).

Lipoksini mogu nastati i samo u neutrofilima tako što će novosintetisana 15-HETE esterifikovana ući u sastav fosfolipida u ćelijskoj membrani i po potrebi, u toku inflamacije, biti oslobođena uz pomoć  $PLA_2$  u citoplazmu i enzimom 5-LOX transformisana do lipoksina (Kantarci i Van Dyke, 2003).

#### ***2.3.3.4. Fiziološka dejstva lipooksigenaznih produkata***

*Leukotrieni (LT)* nastaju u metabolizmu arahidonske kiseline kao produkti 5-lipooksigenaznog puta. LT su biološki aktivni molekuli i igraju važnu ulogu u raznim imunološkim poremećajima i inflamatornim procesima. Kao rezultat njihovog delovanja dolazi do nastanka mnogih bolesti od kojih su danas najprisutnije razne alergije i astma. Zbog tih osobina veoma su intenzivna ispitivanja njihovog metabolizma u cilju pronalaženja što potentnijih inhibitora njihove sinteze i korišćenja istih u terapijske svrhe.

Leukotrieni na ćelije deluju preko membranskih receptora koji pripadaju klasi rodopsinskih receptora. LT receptori se nalaze na membranama raznih ćelija koje učestvuju u imunološkom odgovoru organizma (*Tabela 2.5.*), kao i u ćelijama koje imaju strukturnu ulogu. Aktivirani receptori deluju preko G-proteina koji pokreću razne reakcije u ćeliji, kao što su povećanje intracelularnog  $Ca^{2+}$  i smanjenje intracelularnog cAMP. Ovi signali u ćeliji izazivaju aktivaciju raznih kinaza koje indukuju aktivaciju raznih ćelijskih odgovora od povećane mobilnosti ćelije do aktivacije na nivou transkripcije (Peters-Golden i Henderson, 2007). Leukotrieni izazivaju različite reakcije organizma (Curtis-Prior, 2004), pa tako  $LTB_4$  utiče na hemotaksiju i agregaciju leukocita, permeabilnost krvnih sudova, proliferaciju T-ćelija, sekrecija interleukina 1 i 2;  $LTC_4$  i  $LTD_4$  izazivaju anafilaksiju, vazodilataciju, utiču na permeabilnost krvnih sudova, bronhokonstrikciju, a  $LTE_4$  utiče na vazodilataciju, anafilaksiju i bronhokonstrikciju. Neke bolesti kod kojih je sinteza LT mnogostruko povećana su (Peters-Golden i Henderson, 2007): bolesti disajnih organa (astma, alergijski rinitis, bronhitis, bronhopulmonarna displazija, cistična fibroza, adultni respiratorni distress sindrom (ARDS)), imunološki poremećaji (arthritis,

glomerularni nefritis, giht, psorijaza, reumatoidni artritis, pri transplataciji, razni sistemski imunološki poremećaji kao npr. lupus), kardiovaskularna oboljenja (ateroskleroza, aneurizma aorte), tumori (leukemija, limfomi i tumori raznih organa).

*Lipoksini (LX)* se mogu sintetisati na više načina. Osnovni put jeste transcelularna biosinteza, iako LX mogu nastati i u samo jednoj vrsti ćelija (McMahon i Godson, 2004). Metabolizam arahidonske kiseline koji vodi sintezi LX može biti ostvaren pomoću 5-LOX iz polimorfonuklearnih leukocita i 12-LOX iz trombocita ili pomoću 15-LOX i 5-LOX iz neutrofila.

Najzastupljeniji lipoksini u naučnim ispitivanjima su LXA<sub>4</sub> i LXB<sub>4</sub>. O ulozi ovih eikosanoida se još uvek ne zna dovoljno. Njihova sinteza je povećana u svim procesima gde i sinteza LT, a posebno u procesu inflamacije. Ono što je zanimljivo jeste da oni imaju antiinflamatorno dejstvo, potpuno suprotno od na primer cistein leukotriena i smatra se da je njihova uloga značajna u kontroli stepena odgovora organizma pri inflamaciji (Gaddi i sar., 2004). Oni aktiviraju sintezu halona, glikopeptida koji inhibiraju proces mitoze. U procesima inflamacije LX kontrolišu kretanje neutrofila ka mestu inflamacije, a pri sintezi LX u neutrofilima uz pomoć 5-LOX koncentracija LT se drastično smanjuje (Kantarci i Van Dyke, 2003).

*Hipoksilini (HX)* i *trioksilini (TrX)* nastaju kao produkti 12-LOX puta metabolizma arahidonske kiseline. Kao i kod ostalih eikosanoida, i njihova sinteza se povećava u procesima inflamacije, ali se o njihovoj funkciji još uvek malo zna.

Postoje dve vrste hiposkilina, a to su HXA<sub>3</sub> i HXB<sub>3</sub>, od kojih je samo HXA<sub>3</sub> biološki aktivan. Uloga HX se vezuje za povećanje koncentracije intracelularnog Ca<sup>2+</sup>, kao i za mobilizaciju istog kroz membranu. Poznato je da podstiče sekreciju insulina iz ćelija pankreasa, da inhibira nastanak cistične fibroze u plućima kao i da utiče na sintezu nekih neurotransmitera. Trenutno su intenzivna ispitivanja o ulozi HXA<sub>3</sub> u procesu apoptoze i nastanku tumora (Nigam i sar., 2007).

*Trioksilini* nastaju direktno iz odgovorajućeg HX. Postoje dve vrste TrX, a to su TrXA<sub>3</sub> i TrXB<sub>3</sub>. Prava uloga TrX se još uvek sa sigurnošću ne zna. Povećana sinteza TrX javlja se uglavnom gde i povećana sinteza HX. Jedna od teorija je da je uloga TrX u smanjenju koncentracije HX u organizmu. Njihova velika koncentracija zabeležena je u mnogim bolestima kože, kao što je na primer psorijaza (Antón i sar., 2002).

*12-HETE*, kao i obe vrste 12-LOX, trombocitna i leukocitna, pronađeni su u tumorskim ćelijama različitih organa. Smatra se da ovaj enzim ima veliku ulogu u proliferaciji tumorskih ćelija, kao i u njihovom daljem rastu, jer je zabeležena mnogo veća

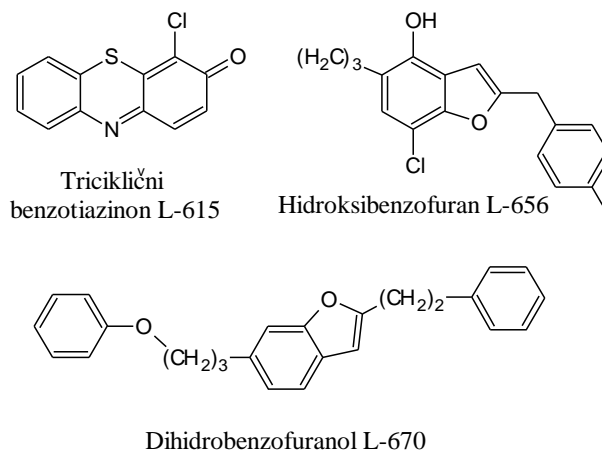
koncentracija 12-LOX u malignim nego u benignim ćelijama tumora prostate, pankreasa, dojki i pluća (Nie i Horn, 2002). Zbog navedenih razloga, pronalaženje što potentnijih inhibitora 12-LOX je danas veoma aktuelno (Ding i sar., 2003).

### 2.3.3.5. Inhibitori lipooksigenaza

*Inhibitori sinteze leukotriena* najveću primenu pronalaze u terapiji lečenja astme i alergija. U zavisnosti na kom mestu inhibiraju metabolizam nastanka LT, njihova podela se može izvršiti na četiri glavne vrste inhibitora:

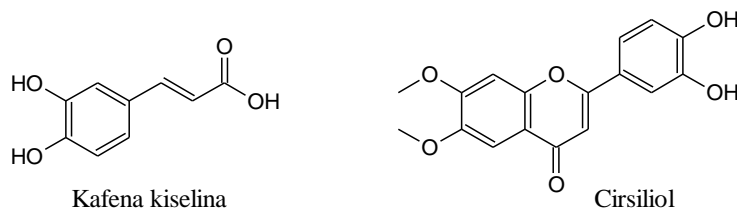
- *inhibitori enzima 5-LOX* (redoks inhibitori, inhibitori sa helatirajućim efektom na jon  $\text{Fe}^{3+}$  u aktivnom centru enzima i kompetitivni reverzibilni ne-redoks inhibitori)
- *FLAP inhibitori*
- *inhibitori LT receptora*
- *inhibitori  $\text{PLA}_2$*

Mehanizam delovanja redoks inhibitora zasniva se na redukciji  $\text{Fe}^{3+}$  jona u aktivnom centru 5-LOX. Još uvek nije nađeno idealno rešenje koji bi inhibitor iz ove grupe mogao da se koristi u terapeutske svrhe. Prvi razlog je da većina pokazuje toksični efekat u kliničkim ispitivanjima. Toksičnost se zasniva uglavnom na produkciji methemoglobina, u kom je jon gvožđa u obliku  $\text{Fe}^{3+}$ , ili na hepatotoksičnom efektu. Drugi razlog je da je apsorbcija ovih molekula u organizmu veoma slaba. Inhibitori iz ove grupe su mali lipofilni molekuli sa jednim ili više aromatičnih prstenova (Young, 1999). Na *Slici 2.38.* prikazane su strukture nekih redoks inhibitora 5-LOX.



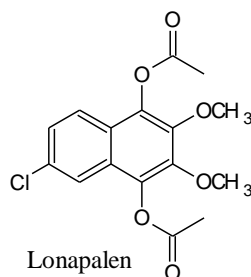
*Slika 2.38. Strukture nekih redoks inhibitora 5-LOX*

Mnogi prirodni proizvodi iz grupe flavonoida i kumarina su prirodni redoks inhibitori 5-LOX. Neki od njih su prikazani na *Slici 2.39*.



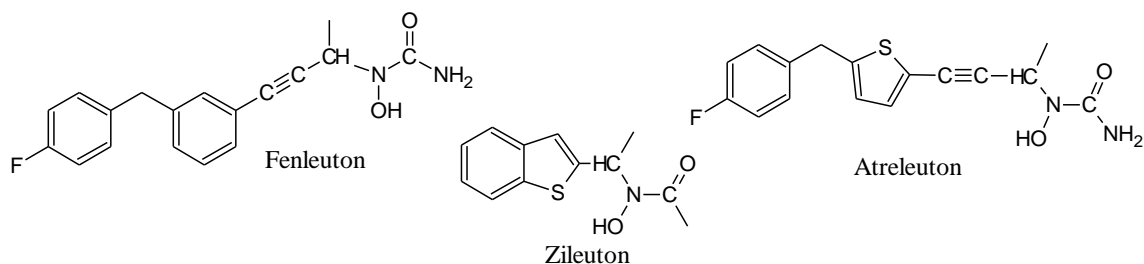
*Slika 2.39.* Strukture prirodnih redoks inhibitora 5-LOX

Jedan od redoks inhibitora koji se primenjuje u terapijski svrhe, ali samo lokalno, je lonapalen (*Slika 2.40.*). Ovaj lek se koristi u terapiji psorijaze i artritisa (Charlier i Michaux, 2003).



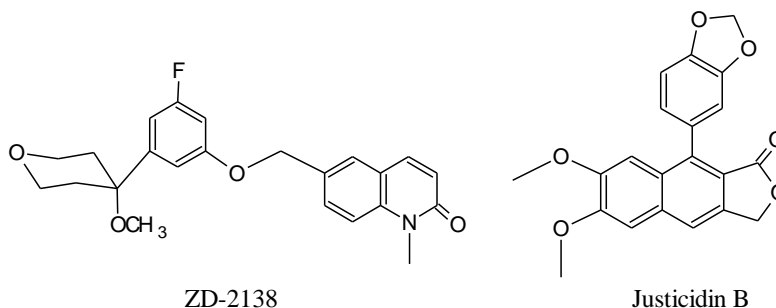
*Slika 2.40.* Struktura lonapalena

Mehanizam dejstva inhibitora enzima 5-LOX sa helatirajućim efektom se zasniva na vezivanju za katalitički centar, tačnije za jon  $\text{Fe}^{3+}$ , pri čemu enzim ne može da katalizuje nastanak 5-HPETE i tako inhibira nastanak LT. Najpotentniji inhibitori ove vrste su molekuli iz grupe *N*-hidroksi uree. Ova vrsta inhibitora je našla primenu u terapijske svrhe, i lekovi protiv astme i alergija pripadaju upravo ovoj grupi (Werz i Steinhilber, 2005). Najpoznatiji među njima je zileuton. Struktura zileutona i još nekih 5-LOX inhibitora sa helatirajućim efektom prikazane su na *Slici 2.41*.



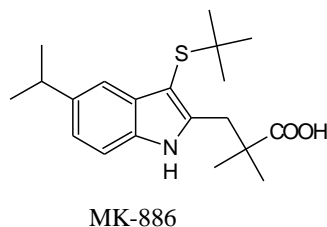
*Slika 2.41.* Struktura 5-LOX inhibitora sa helatirajućim efektom

Kompetitivni reverzibilni ne-redoks inhibitori se ne primenjuju u terapijske svrhe jer do sada ni jedan inhibitor nije ispoljio bolju aktivnost od na primer zileutona. Na *Slici 2.42.* prikazana su dva inhibitora iz ove grupe od kojih je justicidin B prirodni proizvod (Young, 1999).



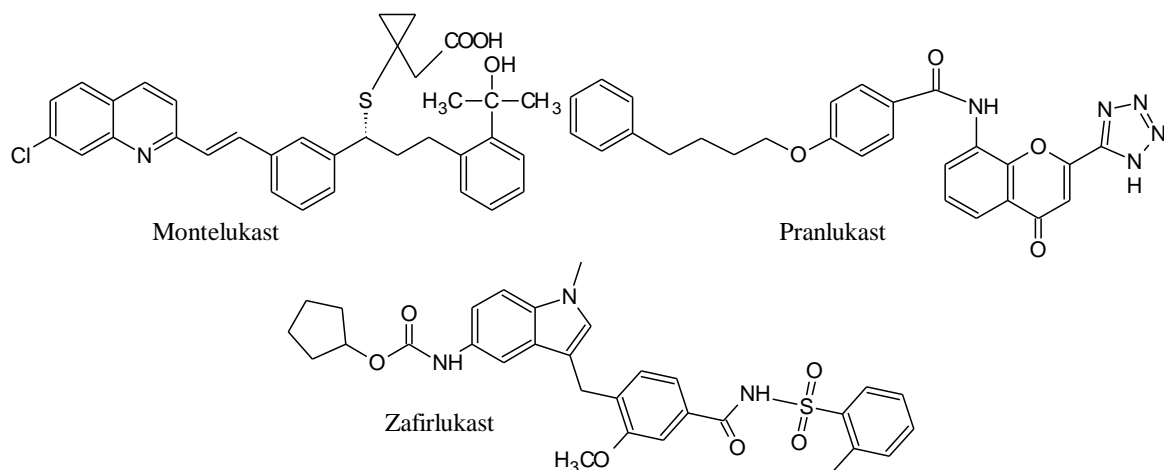
*Slika 2.42.* Kompetitivni reverzibilni ne-redoks inhibitori

FLAP inhibitori se vezuju za FLAP i time onemogućavaju vezivanje arahidonske kiseline. Bez interakcije FLAP-a i arahidonske kiseline dalje reakcije sinteze LT nisu moguće. Najpotentniji inhibitor iz ove grupe je MK-886 (*Slika 2.43.*), ali još uvek se ne koristi u terapijske svrhe (Young, 1999).



*Slika 2.43.* FLAP inhibitor

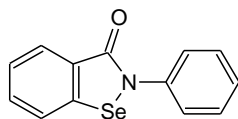
Inhibitori leukotrienskih receptora su našli veliku terapijsku primenu. Oni se vezuju za LT receptore onemogućujući delovanje leukotriena i reakcija organizma koju izazivaju LT izostaje (Bernstein, 1998). Zbog toga se ovi inhibitori intenzivno koriste u terapiji astme, a najpotetniji su: zafirlukast, montelukast i pranlukast (*Slika 2.44.*).



Slika 2.44. Strukture odabranih inhibitora LT receptora

Iako su do sada najbolje proučeni inhibitori puta sinteze leukotriena, posljednjih godina, kako se povećavaju saznanja o biološkom dejstvu lipoksina, 12-HETE, hipoksilina i triksilina, inhibitori 12-LOX i 15-LOX postaju sve zanimljiviji. Tako na primer, od kada je poznato da je 12-LOX važan faktor u rastu i razvoju tumora, sve se više truda ulaže u pronalaženje njegovih inhibitora. Niz prirodnih prirodnih proizvoda, kao na primer bajkalein, eskuletin, gossipin, kvercetin i dr. (Poglavlje 2.4.2.), pokazuju 12-LOX inhibitornu aktivnost (Schneider i Bucar, 2005).

Na Slici 2.45. prikazan je ebselen koji inhibira 15-LOX enzim tako što se vezuje za  $\text{Fe}^{3+}$  u aktivnom centru ovog enzima. Iako je najpotentniji prema 15-LOX, ovo jedinjenje inhibira i ostale LOX (Walther i sar., 1999).



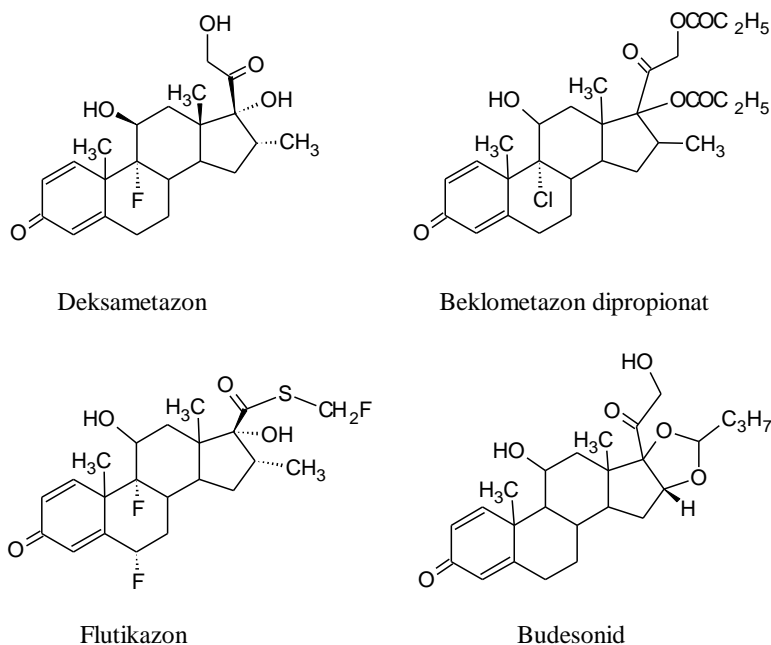
Ebselen

Slika 2.45. Struktura ebselena

Grupa inhibitora  $\text{PLA}_2$  spada u grupu steroidnih antiinflamatornih inhibitora sinteze eikosanoida uopšte. Glikokortikoidi koji se koriste kao antiinflamatorni agensi, a odnose se na metabolizam arahidonske kiseline, inhibiraju delovanje  $\text{PLA}_2$  i samim tim sprečavaju oslobađanje arahidonske kiseline iz ćelijske membrane zbog koga sinteza svih eikosanoida izostaje (Rang i sar., 2004).

Mehanizam delovanja glikokortikoida je isti kao i kod ostalih steroidnih hormona, a podrazumeva delovanje preko receptora koji se nalaze u jedru uz pomoć kojih se

ostvaruje regulacija na nivou transkripcije. Aktiviran receptor se vezuje za određeni domen DNA u jedru i aktivira transkripciju gena proteina lipokortina-1 koji zatim inhibira PLA<sub>2</sub> (Barnes, 1998). Glikokortikoidi koji se najčešće primenjuju u antinflatamatornoj terapiji su: deksametazon, beklometazon dipropionat, flutikazon i budesonid, a njihove strukture su prikazane na *Slici 2.46*.



*Slika 2.46. Strukture nekih glukokortikoida*

## 2.4. In vitro metode za određivanje antiinflatamatornog potencijala

### 2.4.1. In vitro testovi za određivanje ciklooksigenazne aktivnosti

U cilju ispitivanja i poređenja relativnih inhibitornih aktivnosti nesteroidnih antiinflatamatornih lekova prema ciklooksigenazi-1 i ciklooksigenazi-2, razvijen je veliki broj *in vitro* metoda (Pairet i van Ryn, 1998). Ovi test-sistemi mogu biti podeljeni u tri grupe:

- prvi razvijeni testovi u kojima se koriste enzimi, ćelije ili ćelijske linije životinjskog porekla
- testovi u kojima se koriste humani rekombinantni enzimi, ćelijske linije ili ćelije krvi (u glavnom trombociti i monociti), a čija upotreba je najrasprostranjenija
- novorazvijene metode u kojima se koriste ciljane ćelije (humane ćelije želudačne sluznice, hondrociti, sinoviociti)

Pregled najčešće korišćenih metoda sa fokusom na određivanje COX-1 inhibitorne aktivnosti dat je u *Tabeli 2.6*.

*Tabela 2.6. In vitro testovi za karakterizaciju COX-1 inhibitorne aktivnosti nesteroidnih antiinflamatornih lekova*

Poreklo COX-1	Reference
COX-1 izolovana iz ovčijih seminalnih vezikula	Futaki i sar., 1994; Jäger i sar., 2007; Prior i sar., 2007; Mulabagal i sar., 2010
Delovi humane želudačne sluznice	Tavares i sar., 1995
Govede aortne endotelne ćelije	Mitchel i sar., 1993
Govedi trombociti	Scholz i sar., 2009
Humana ćelijska linija (histiocitične ćelije limfoma U-937)	Prasit i sar., 1995
Humana krv	Warner i sar., 1999; Sud'ina i sar., 2008
Humana zgrušana krv (trombociti)	Patrignani i sar., 1994; Young i sar., 1996; Brideau i sar., 1996; Patrignani i sar., 1997; Prasit, 1997; Warner, 1997
Humani hondrociti (nestimulisani)	Blanco i sar., 1999
Humani monociti	Demasi i sar., 2000
Humani rekombinantni enzim (prečišćen, u mikrozomima ili celim ćelijama)	Barnett i sar., 1994; Copeland i sar., 1994; Laneuville i sar., 1994; O'Neill i sar., 1994; Glaser i sar., 1995; Gierse i sar., 1995; Churchill i sar., 1996; Cromlish i sar., 1996; Kargman i sar., 1996; Rinedeau i sar., 1997; Smith i sar., 1998;
Humani sinoviociti (nestimulisani)	Vergne i sar., 1997
Humani trombociti	Safayhi i sar., 1992; Ammon i sar., 1993; Klein i sar., 1994; Nakatsuka i Osawa, 1994; Satoh i sar., 1994; Kawai i sar., 1998; You i sar., 1999; Siemoneit i sar., 2008
Izolovana ovčija COX-1	Siemoneit i sar., 2008
Makrofage zamorčeta (nestimulisane)	Engelhardt i sar., 1996
Mikrozomi iz govedih semenih vezikula	Noreen i sar., 1998; El-Seedi i sar., 2003; Selvam i sar., 2004;
Peritonealne makrofage miša	Abad i sar., 2006
Rekombinantni enzim miša	Meade i sar., 1993
Trombociti zeca	Sakuma i sar., 1998;



Eksperimentalni uslovi u navedenim testovima (*Tabela 2.6.*) razlikuju se u velikoj meri. Enzimi koji se koriste mogu biti humanog ili životinjskog porekla, nativni ili rekombinantni, izolovani, u mikrozomima ili u ćeliji. Takođe, arahidonska kiselina može biti endogeno oslobođena ili egzogena, u velikom rasponu početnih koncentracija. Različiti sistemi se koriste i za gensku ekspresiju rekombinantnog COX-1 enzima. Način indukcije, vreme inkubacije arahidonske kiseline ili ispitivanog jedinjenja variraju u različitim testovima, kao i koncentracija proteina prisutna u medijumu, koja ima značajnu ulogu jer se nesteroidni antiinflamatorni lekovi snažno vezuju za proteine iz plazme (Pairet i van Ryn, 1998). Niz metoda se koristi za detekciju metabolita: preparativna TLC i radioaktivno merenje, HPLC sa UV detektorom ili EIA (*enzyme immunoassay*), kao i kvantifikacija egzogene [ $^{14}\text{C}$ ]-arahidonske kiseline uz primenu radiometrijskih tehnika.

Pri izboru metode, pored reproduktivnosti i mogućnosti za eksperimentalno izvođenje testa, važno je uzeti u obzir i sam cilj ispitivanja. Naime, ako se ispituje interakcija jedinjenja i aktivne strane enzima na molekulskom nivou, tada treba izabrati izolovani enzim. Za skrining ili određivanje zavisnosti struktura-aktivnost, humane ćelijske linije, u kojima je ekspresija ili COX-1 ili COX-2 enzima konstitutivna i humani rekombinantni enzimi predstavljaju najpogodnije sisteme. U slučaju da je cilj ispitivanja klinička relevantnost selektivne COX-2 inhibicije, najčešći primenjivani sistemi su humani rekombinantni enzimi u intaktnim ćelijama i humana krv (*whole-blood assay*; Pairet i van Ryn, 1998).

#### ***2.4.2. In vitro testovi za određivanje 12-lipooksigenazne aktivnosti***

Jasan i sažet pregled *in vitro* testova za određivanje aktivnosti i inhibicije 12-lipooksigenaze prikazan je u radu Schneider i Bucar-a (2005). U većini ovih testova korišćen je izolovani enzim, a ne intaktne ćelije. Testovi u kojima se koriste intaktne ćelije najčešće podrazumevaju upotrebu humanih, goveđih, ovčijih, kao i trombocita pacova, dok su u samo nekoliko postupaka primenjeni trombociti miševa i zamoraca.

Jedna od podela 12-lipooksigenaznih *in vitro* testova (Schneider i Bucar, 2005) zasnovana je upravo na vrsti trombocita, odnosno poreklu izolovanog enzima i sastoji se od jedanaest grupa (**A-K**; *Tabela 2.7.*), a navedeni rad takođe daje i pregled biljnih ekstrakata, kao i prirodnih proizvoda koji pokazuju 12-LOX inhibitornu aktivnost (*Tabela 2.7.*).

Tabela 2.7. Prirodni proizvodi sa 12-LOX inhibitornom aktivnosti

Prirodni proizvod	Tip testa	Aktivnost (inhibicija stvaranja 12-(S)-HETE)	Reference
Bajkalein	<b>E</b>	64.2% inhibicije 12-LOX pri 100 $\mu$ M (12(S)-HETE)	You i sar., 1999
	<b>I</b>	IC <sub>50</sub> = 24.6 $\mu$ M (12(S)-HETE)	Schneider i sar., 2004
Cirsiliol	<b>J</b>	IC <sub>50</sub> = 100 $\mu$ M (12(S)-HETE)	Ferrandiz i sar., 1990
Eskuletin	<b>D</b>	IC <sub>50</sub> = 0.65 $\mu$ M (12(S)-HETE)	Sekiya i sar., 1982
Eugenol	<b>E</b>	IC <sub>50</sub> = 65 $\pm$ 4 $\mu$ M (12(S)-HETE)	Saeed i sar., 1995
Falkarinidol	<b>A</b>	IC <sub>50</sub> = 48 $\mu$ M	Alanko i sar., 1994
	<b>E</b>	IC <sub>50</sub> = 100 $\mu$ M	Alanko i sar., 1994
Gosipetin	<b>J</b>	IC <sub>50</sub> = 39.8 $\mu$ M (12(S)-HETE)	Ferrandiz i sar., 1990
Gosipin	<b>J</b>	IC <sub>50</sub> = 42.1 $\mu$ M (12(S)-HETE)	Ferrandiz i sar., 1990
Hibifolin	<b>J</b>	IC <sub>50</sub> = 63.0 $\mu$ M (12(S)-HETE)	Ferrandiz i sar., 1990
Hinokitiol	<b>E</b>	IC <sub>50</sub> = 0.1 $\mu$ M	Suzuki i sar., 2000
Hipoleatin	<b>A</b>	IC <sub>50</sub> = 50 $\mu$ M	Suzuki i sar., 2000
Hipolaetin-8-O- $\beta$ -D-glukozid	<b>J</b>	IC <sub>50</sub> = 33.8 $\mu$ M (12(S)-HETE)	Ferrandiz i sar., 1990
Leukocijanidol	<b>J</b>	IC <sub>50</sub> = 4.2 $\mu$ M (12(S)-HETE)	Ferrandiz i sar., 1990
Orokslin A	<b>E</b>	IC <sub>50</sub> = 100 $\mu$ M	You i sar., 1999
Panaksinol	<b>A</b>	IC <sub>50</sub> = 1 $\mu$ M	Alanko i sar., 1994
	<b>E</b>	IC <sub>50</sub> = 67 $\mu$ M	Alanko i sar., 1994
Kvercetagetin-7-O- $\beta$ -D-glukozid	<b>J</b>	IC <sub>50</sub> = 5.9 $\mu$ M (12(S)-HETE)	Ferrandiz i sar., 1990
Kvercetin	<b>E</b>	39,2% inhibicije 12-LOX pri 100 $\mu$ M 12(S)-HETE	You i sar., 1999
	<b>J</b>	IC <sub>50</sub> = 2.5 $\mu$ M (12(S)-HETE)	Ferrandiz i sar., 1990
	<b>K</b>	IC <sub>50</sub> = 30 $\mu$ M (12/15-HETE)	Kim i sar., 1998
Sideritoflavon	<b>J</b>	IC <sub>50</sub> = 2.5 $\mu$ M (12(S)-HETE)	Ferrandiz i sar., 1990

U navedenim grupama *in vitro* testova (**A-K**) za određivanje potencijala inhibicije 12-LOX koriste se sledeći izvori izolovanog enzima, odnosno vrste trombocita:

- A.** 12-LOX iz svinjskih leukocita (Reddi i sar., 1991; Alanko i sar. 1994; Suzuki i sar., 2000; Li i sar., 2003)
- B.** 12-LOX iz citosola pluća pacova (Bezakova i sar., 1996a; Bezakova i sar., 1996b)
- C.** 12-LOX iz goveđih trombocita (Chi i sar., 2001)
- D.** 12-LOX iz trombocita pacova (Sekiya i sar., 1982; Noriko i Keizo, 1997; Nogata i sar., 2001)
- E.** 12-LOX iz humanih trombocita (Saeed i sar., 1995; You i sar., 1999; Alanko i sar., 1994; Suzuki i sar., 2000)
- F.** Trombociti pacova (De la Puerta i sar., 1999)
- G.** 12-LOX iz epiderma miševa (Vavreckova i sar., 1996)
- H.** Zečiji trombociti (Sakuma i sar., 1998)
- I.** Humani trombociti (Ammon i sar., 1993; Schneider i sar., 2004.)
- J.** 12-LOX iz ovčijih trombocita (Ferrandiz i sar., 1990)
- K.** 12-LOX iz epidermalnog homogenata zamoraca (Kim i sar., 1998).

Uopšteno, standardni testovi kojima se određuje inhibicija 12-lipooksigenaze najčešće podrazumevaju upotrebu izolovanog enzima 12-lipooksigenaze, redukovano glutatona, ispitivanog ekstrakta ili jedinjenja i arahidonske kiseline. Reakcija se odigrava u puferu i zaustavlja dodatkom kiseline. Merenje 12-LOX aktivnosti vrši se kvantifikacijom 12(S)-HETE metabolita preparativnom TLC i radioaktivnim merenjem, HPLC-om sa UV detektorom i retko pomoću EIA (*enzyme immunoassay*) ili kvantifikacijom same [ $^{14}\text{C}$ ]-arahidonske kiseline uz primenu radiometrijskih tehnika. Flavonoid bajkalein se često koristi kao pozitivna kontrola (Schneider i Bucar, 2005).

### 3. EKSPERIMENTALNI DEO

*Opšte metode:* Rastvarači su uparavani na rotacionom vakuum uparivaču pri temperaturama vodenog kupatila do 45°C. Vrednosti apsorbancija rastvora su izmerene na spektrofotometru CECIL CE 2021 Series 2000, odnosno Thermo scientific Multiskan spectrum (testovi prilagođeni za mikro-ploče). LC-MS/MS analiza je urađena pomoću HPLC (Agilent Technologies serije 1200) sa tripl-kvad (QqQ) MS-MS serije 6410B sa elektrosprej jonizacijom (ESI). Za kontrolu instrumenta i obradu podataka korišćen je softver MassHunter, verzija B.01.03. (Agilent Technologies). Svaki uzorak je, pre LC-MS/MS analize, proceden kroz Econofilter (Agilent Technologies, membrane syringe filter, 0.2 µm). Za centrifugiranje korišćene su centrifuge Sigma 2-5 (max 2300 × g) i Sigma 3-18K (max 14239 × g).

*Reagensi:* Reagensi poručeni od Sigma-Aldrich Chemicals, Steinheim, Germany su: acetilsalicilna kiselina (aspirin), aukubin, bajkalein, bajkalin, 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroksitoluen (BHT), 2-deoksi-D-riboza, fenazin metosulfat (PMS), galna kiselina, 12(*S*)-hidroksi-(5*Z*,8*E*,10*E*)-heptadekatrien-kiselina (12-HHT), 12(*S*)-hidroksi-(5*Z*,8*Z*,10*E*,14*Z*)-eikozatetraen-kiselina (12-HETE), kalcijumova jonofora A23187 (kalcimicin), kvercetin, NADH i prostaglandin B<sub>2</sub> (PGB<sub>2</sub>). Folin-Ciocalteu (FC) reagens je poručen od Fisher Scientific, Leicestershire, UK. 2,2-Difenyl-1-picrilhidrazil (DPPH), 2-tiobarbiturna kiselina (TBA), sulfanilamid i rutin su proizvodi Fluka Chemie GmbH (Buchs, Switzerland). Trihlorsirćetna kiselina je poručena od Lach-Ner sro (Neratovice, Czech Republic), tetrazolijum nitro-plavo (NBT) od Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany), a natrijum nitroprusid od Reanal (Budapest, Hungary). *N*-(1-Naftil)etilendiamin dihidrohlorid (NEDA), askorbinska kiselina i 2,4,6-tripiridil-*s*-triazin (TPTZ) su proizvodi Merck (Darmstadt, Germany). Tween-80 je dobijen od J. T. Baker (Deventer, The Netherlands), a luteolin i apigenin od ChromaDex (Santa Ana, CA). Luteolin-7-*O*-glukozid i apigenin-7-*O*-glukozid su nabavljeni od Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany). Ostali reagensi bili su takođe analitičke čistoće.

*Statističke metode:* Odgovarajuće krive (funkcija inhibicije u zavisnosti od koncentracije, odnosno funkcija apsorbancije u zavisnosti od koncentracije) na osnovu kojih su određene IC<sub>50</sub> vrednosti ili odgovarajući ekvivalenti, kao i kalibracione krive standardnih jedinjenja, urađene su pomoću softvera Origin, verzija 8. Svi testovi su rađeni

u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. Dobijeni podaci su statistički obrađeni *one-way* ANOVA testom ( $p < 0.05$ ).

### 3.1. Priprema biljnih ekstrakata

Biljni materijal sakupljen je na području Republike Srbije i Republike Crne Gore u periodu 2006-2009. godine. U cilju biohemijskih ispitivanja taksona roda *Plantago* L. biljni materijal je pregledan i kolektovan u Voucher collection Herbariuma BUNS. Determinaciju je izvršio dr Goran Anačkov, asistent na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu. U *Tabeli 3.1.* prikazani su osnovni podaci o brojevima vaučera, lokalitetu i datumu sakupljanja ispitivanih vrsta bokvica.

*Tabela 3.1.* Podaci iz vaučera ispitivanih vrsta roda *Plantago*

Broj vaučera	Vrsta	Lokalitet		Datum
2-1804	<i>Plantago altissima</i> L. 1753	Novi Sad Kej UTM34TDR201	nasip na aluvijumu	06.06.2009.
2-1833	<i>Plantago argentea</i> Chaix in Vill. 1786	Rtanj UTM34TEP464	livada	30.04.2008
2-1832	<i>Plantago bellardii</i> All. 1785 subsp. <i>bellardii</i>	Crna Gora Ulcinj Velika plaža "Hotel Otrant" UTM34TCM454	livada na pesku	04.05.2008.
2-1826	<i>Plantago coronopus</i> L. 1753 subsp. <i>coronopus</i>	Niš Lalinačka slatina	slatinska livada	06.08.2007.
2-1831	<i>Plantago coronopus</i> L. 1753 subsp. <i>coronopus</i>	Crna Gora Čanj UTM 34T CM 1 37	peščana plaža	06.05.2008.
2-1824	<i>Plantago holosteum</i> Scop. 1771 subsp. <i>holosteum</i>	Dimitrovgrad UTM34TFN146	kserofilni kamenjarski pašnjak	12.08.2006.
2-1842	<i>Plantago holosteum</i> Scop. 1771 subsp. <i>holosteum</i>	Kopaonik Brzeće „Vodopad“ UTM34TDN389	na stenama	28.07.2006.

2-1829	<i>Plantago lanceolata</i> L. 1753	Fruška Gora Vrdnik UTM34TDQ09	ruderalno stanište	07.06.2008.
2-1834	<i>Plantago lanceolata</i> L. 1753	Zlatar Nova Varoš UTM34TDP2801	pored puta	23.07.2007.
2-1835	<i>Plantago lanceolata</i> L. 1753	Crna Gora Bar, Šušanj UTM34TCM456	pored puta	06.2007.
2-1836	<i>Plantago lanceolata</i> L. 1753	Kopaonik Brzeće „Junior“ UTM34TDN388	pored puta	26.07.2006.
2-1830	<i>Plantago major</i> L. 1753 subsp. <i>major</i>	Fruška Gora Vrdnik UTM34TDQ09	ruderalno stanište	07.06.2008.
2-1845	<i>Plantago major</i> L. 1753 subsp. <i>major</i>	Zlatar Nova Varoš UTM34TDP2801	pored puta	23.07.2007.
2-1847	<i>Plantago major</i> L. 1753 subsp. <i>major</i>	Novi Sad UTM34TDR201	pored puta	06.08.2006.
2-1848	<i>Plantago major</i> L. 1753 subsp. <i>major</i>	Kopaonik Brzeće „Junior“ UTM34TDN388	pored puta	26.07.2006.
2-1827	<i>Plantago maritima</i> L. 1753	Padej UTM 34TDR37	slatinska livada	30.06.2007.
2-1838	<i>Plantago media</i> L. 1753	Zlatar Nova Varoš UTM34TDP2801	livada	23.07.2007.
2-1841	<i>Plantago media</i> L. 1753	Kopaonik Brzeće put prema rezervatu „Duboka“ UTM34TDN388	livada	28.07.2006.
2-1828	<i>Plantago reniformis</i> G. Beck 1887	Crna Gora Prokletije Vizitor UTM34TDN201	stenovita mesta	23.07.2007.
2-1825	<i>Plantago schwarzenbergiana</i> Schur 1855	Padej UTM 34TDR37	slatinska livada	30.06.2007.

Priprema metanolnih ekstrakata svih navedenih vrsta urađena je po istoj proceduri: odmereno je 30 g osušenog nadzemnog dela biljke, usitnjeno, preliveno sa 300 mL 80%

metanola i macerirano u toku 72 časa na sobnoj temperaturi. Nakon ceđenja preko Büchner-ovog levka i uparavanja na rotacionom vakuum uparivaču, suvi ostatak sirovog ekstrakta je rastvoren u toploj destilovanoj vodi (1 mL dH<sub>2</sub>O po g suvog ostatka). U cilju uklanjanja nepolarnih komponenti, ovaj rastvor je ispiran petrol-etrom (frakcija 40-60°C) do potpunog obezbojavanja petrol-etarskog sloja, a zatim uparen na rotacionom vacuum uparivaču do suva. U *Tabeli 3.2.* prikazani su odgovarajući prinosi prečišćenog, suvog ekstrakta.

*Tabela 3.2.* Prinosi metanolnih ekstrakata ispitivanih vrsta roda *Plantago*

Vrsta	Prinos
<i>Plantago altissima</i> , Novi Sad	15.74%
<i>Plantago argentea</i> , Rtanj	19.77%
<i>Plantago bellardii</i> , Ulcinj	15.88%
<i>Plantago coronopus</i> , Čanj	9.56%
<i>Plantago coronopus</i> , Niš	14.39%
<i>Plantago holosteum</i> , Dimitrovgrad	9.59%
<i>Plantago holosteum</i> , Kopaonik	10.87%
<i>Plantago lanceolata</i> , Bar	13.45%
<i>Plantago lanceolata</i> , Fruška gora	10.08%
<i>Plantago lanceolata</i> , Kopaonik	12.74%
<i>Plantago lanceolata</i> , Zlatar	17.22%
<i>Plantago major</i> , Fruška gora	11.30%
<i>Plantago major</i> , Kopaonik	12.42%
<i>Plantago major</i> , Novi Sad	10.50%
<i>Plantago major</i> , Zlatar	12.16%
<i>Plantago maritima</i> , Padej	10.06%
<i>Plantago media</i> , Kopaonik	17.54%
<i>Plantago media</i> , Zlatar	11.98%
<i>Plantago reniformis</i> , Vizitor	17.20%
<i>Plantago schwarzenbergiana</i> , Padej	15.36%

Suvi ostatak je zatim rastvoren u nekoliko sistema, koji su korišćeni u odgovarajućim testovima:

- u smeši 1% mravlje kiseline i metanola (odnos 9:1) napravljeni su rastvori koncentracije 2 mg/mL, koji su korišćeni za određivanje kvantitativnog sastava primenom LC-MS/MS tehnike
- u 80% metanolu napravljeni su osnovni rastvori koncentracije 20 mg/mL, koji su korišćeni za ispitivanje antioksidantnog potencijala
- u DMSO napravljeni su osnovni rastvori koncentracije 200 mg/mL, koji su korišćeni za ispitivanje antiinflamatornog potencijala

### **3.2. LC-MS/MS analiza**

#### **3.2.1. HPLC-MS analiza ispitivanih ekstrakata**

Za hromatografsko razdvajanje korišćena je Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 mm × 50 mm × 1.8 µm (Agilent Technologies) reversno-fazna kolna pri temperaturi od 35°C. Binarna mobilna faza sastojala se od 1% mravlje kiseline (A) i metanola (B), a protok je iznosio 0.5 mL/min. Primenjen je gradijentni mod, koji je podrazumevao sledeći odnos faza: 0 min 20% B, 15 min 40% B, 30 min 90% B, 35 min 90% B, sa post-vremenom od 5 min. Injektovana zapremina svih uzoraka je bila 10 µL. ESI parametri bili su: gas za sušenje (N<sub>2</sub>) temperature 350°C, protok 9 L/min, pritisak gasa nebulajzera 35 psi, napon na kapilari 4 kV i napon na fragmentoru 100 V. Akvizicija je izvršena u pozitivnom MS2Scan modu u opsegu m/z 100-650.

#### **3.2.2. Kvantitativno određivanje sadržaja aukubina**

Sadržaj aukubina u ispitivanim metanolnim ekstraktima određen je primenom LC-MS/MS tehnike. Za hromatografsko razdvajanje korišćena je Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 mm × 50 mm × 1.8 µm (Agilent Technologies) reversno-fazna kolna pri temperaturi od 35°C. Binarna mobilna faza sastojala se od 1% mravlje kiseline (A) i metanola (B), a protok je iznosio 0.5 mL/min. Primenjen je gradijentni mod, koji je podrazumevao sledeći odnos faza: 0 min 10% B, 15 min 40% B, 25 min 90% B, 30 min 90% B, sa post-vremenom od 5 min. Injektovana zapremina svih uzoraka je bila 1 µL. ESI parametri bili su: gas za sušenje (N<sub>2</sub>) temperature 350°C, protok 9 L/min, pritisak gasa nebulajzera 35 psi, napon na kapilari 4 kV i napon na fragmentoru 140 V. Kvantifikacija aukubina je izvršena u pozitivnom MS2SIM (*selected ion monitoring, single-stage MS*) modu,



praćenjem sledećih jona:  $[M+H]^+$  na  $m/z$  347,  $[M+Na]^+$  na  $m/z$  369 i  $[M+K]^+$  na  $m/z$  385, pri čemu je retenciono vreme bilo 2.535 min. Određivanje sadržaja aukubina u ispitivanim ekstraktima je urađeno na osnovu standardne kalibracione krive aukubina koncentracije 0.05-1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

### 3.2.3. Kvantitativno određivanje sadržaja odabranih flavonoida

U cilju kvantifikacije flavonoida apigenina, apigenin-7-*O*-glukozida, luteolina, luteolin-7-*O*-glukozida, kvercetina i rutina urađena je LC-MS/MS analiza ispitivanih ekstrakata vrsta roda *Plantago*. Optimalni uslovi za kvantifikaciju navedenih jedinjenja podrezumevaju različite MS akvizicione modove i polarnost, pa je zbog toga sadržaj ovih jedinjenja određen u dva odvojena *postupka*, pri čemu je u prvom simultano određen sadržaj apigenina, apigenin-7-*O*-glukozida, luteolina i luteolin-7-*O*-glukozida, a u drugom kvercetina i rutina.

Pri kvantitativnom određivanju apigenina, apigenin-7-*O*-glukozida, luteolina i luteolin-7-*O*-glukozida, razdvajanje je postignuto pomoću reverzno-fazne kolone Zorbax Eclipse XDB-C18 RR 4.6 mm  $\times$  50 mm  $\times$  1.8  $\mu\text{m}$  (Agilent technologies) na 45 °C. ESI parametri su bili: gas za sušenje ( $\text{N}_2$ ) temperature 350°C, protok 9 L/min, pritisak gasa nebulajzera 40 psi, napon na kapilari 4 kV. Zapremina injektovanih uzoraka bila je 5  $\mu\text{L}$ . Binarna mobilna faza sastojala se od 1% vodene mravlje kiseline (A) i metanola (B), sa protokom od 0.6 mL/min. Korišćen je sledeći gradijent mobilne faze: 0.0 min 10% B, 15.0 min 40% B, 25.0 min 90% B, 30.0 min 90% B, uz post-vreme analize 5.0 min. Ostali optimizovani parametri prikazani su u *Tabeli 3.3*. Sva jedinjenja kvantifikovana su u MRM (*multiple reaction monitoring*) modu, osim luteolin-7-*O*-glukozida, gde je korišćen MS2SIM (*selected ion monitoring, single-stage MS*) mod.

*Tabela 3.3.* LC-MS/MS parametri za kvantifikaciju luteolin-7-*O*-glukozida, apigenin-7-*O*-glukozida, luteolina i apigenina

Jedinjenje	Retenciono vreme (min)	Mod	Polarnost jona	Jonska vrsta	Jon prekursor (m/z)	Jon proizvod (m/z)	Koliziona energija (V)	Napon fragmentora (V)
Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid	16.5	MS2SIM	+	$(M+H)^+$ $(M+Na)^+$	449 471	-	-	80
Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid	18.5	MRM	+	$(M+H)^+$	433	271	10	100
Luteolin	21.4	MRM	-	$(M-H)^-$	285	133	35	80
Apigenin	22.5	MRM	+	$(M+H)^+$	271	153	40	80

Pri kvantitativnom određivanju rutina i kvercetina, razdvajanje je postignuto pomoću reverzno-fazne kolone Zorbax Eclipse XDB-C18 RR 4.6 mm × 50 mm × 1.8 μm (Agilent technologies) na 45 °C. ESI parametri su bili: gas za sušenje (N<sub>2</sub>) temperature 350°C, protok 9 L/min, pritisak gasa nebulajzera 40 psi, napon na kapilari 4 kV. Zapremina injektovanih uzoraka bila je 5 μL. Binarna mobilna faza sastojala se od 1% vodene mravlje kiseline (A) i metanola (B), sa protokom od 0.6 mL/min. Korišćen je sledeći gradijent mobilne faze: 0.0 min 30% B, 15.0 min 90% B, 18.0 min 90% B, uz post-vreme analize 3.0 min. Ostali optimizovani parametri prikazani su u *Tabeli 3.4*. Sva jedinjenja kvantifikovana su u MRM (*multiple reaction monitoring*) modu.

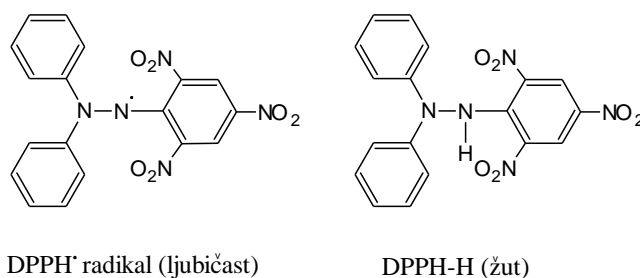
*Tabela 3.4.* LC-MS/MS parametri za kvantifikaciju rutina i kvercetina

Jedinjenje	Retenciono vreme (min)	Mod	Polarnost jona	Jonska vrsta	Jon prekursor (m/z)	Jon proizvod (m/z)	Koliziorna energija (V)	Napon fragmentora (V)
Rutin	4.5	MRM	-	(M-H) <sup>-</sup>	609	300	50	140
Kvercetin	7.2	MRM	-	(M-H) <sup>-</sup>	301	151	30	140

### 3.3. Određivanje antioksidantnog potencijala

#### 3.3.1. Određivanje neutralizacije DPPH<sup>•</sup> radikala

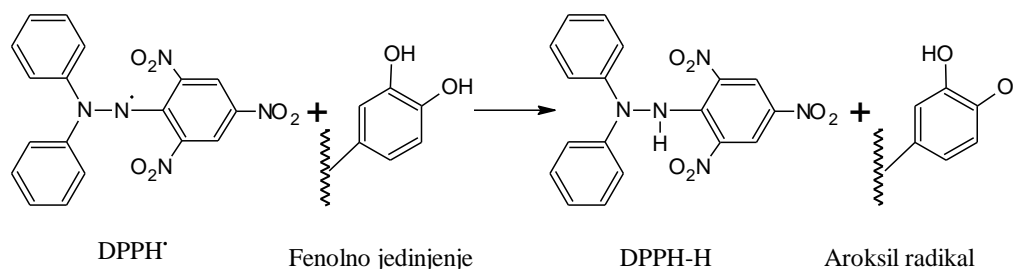
Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH<sup>•</sup> (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikala urađeno je primenom spektrofotometrijske metode (Espin i sar., 2000), prilagođene za mikro ploče, koja je zasnovana je na praćenju promene boje ljubičasto obojenog rastvora stabilnog azot-centriranog DPPH<sup>•</sup> radikala u redukovanu, žuto obojenu formu, DPPH-H. Pojava žute boje objašnjava se sposobnošću pojedinih komponenata da deluju kao donori vodonika ili elektrona, pri čemu DPPH<sup>•</sup> prelazi u redukovani neutralni DPPH-H oblik (*Slika 3.1.*).



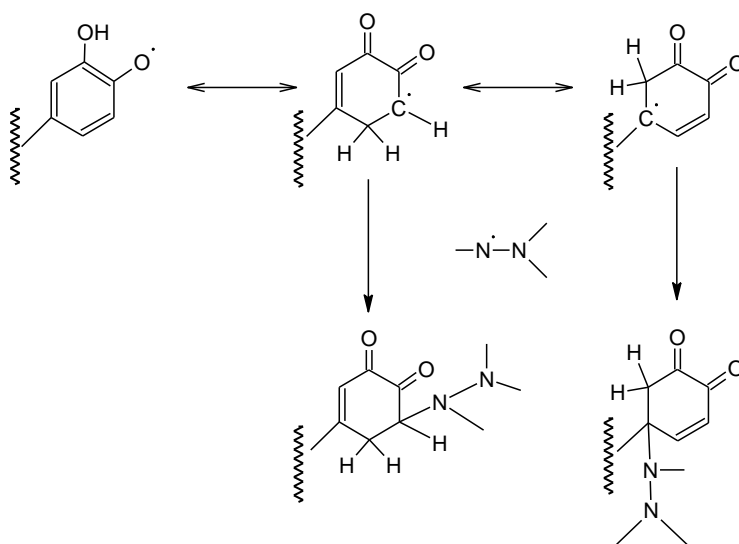
*Slika 3.1.* Radikalska i redukovana forma DPPH<sup>•</sup>

Neutralizacija DPPH<sup>•</sup> fenolnim jedinjenjima odvija se pomoću dva simultana mehanizma. Najpre, fenolno jedinjenje deluje kao donor H-atoma pri čemu nastaje redukovani, neutralni DPPH-H oblik i ariloksi radikal koji je rezonantno stabilizovan, a zatim, nastali ariloksil radikal može da reaguje sa još jednim DPPH<sup>•</sup> radikalom pri čemu dolazi do njihove kondenzacije i prelaska u neutralan molekul (Slika 3.2.).

Predaja H atoma DPPH<sup>•</sup>



"Hvatanje" DPPH<sup>•</sup>



Slika 3.2. Mehanizam „hvatanja“ DPPH<sup>•</sup> pomoću fenolnih jedinjenja

### Reagensi:

1. 3 mmol/L DPPH<sup>•</sup> u etanolu - osnovni rastvor DPPH<sup>•</sup> reagensa: 0.0118 g DPPH<sup>•</sup> rastvoreno (ultrazvučno kupatilo) u 10 mL etanola (rastvor je čuvan u tamnoj boci na 4°C, stabilan 14 dana)
2. 90 μmol/L DPPH<sup>•</sup> u metanolu - radni rastvor DPPH<sup>•</sup> reagensa: 562.5 μL osnovnog rastvora dopunjeno do 25 mL metanolom (rastvor je pripremljen na dan merenja)
3. Početne koncentracije ekstrakata i standarda BHA i BHT: 0.078, 0.156, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0 i 10.0 mg/mL

**Postupak:**

Od ekstrakta početne koncentracije 0.2 g/mL napravljena je serija sedam/osam rastvora dvostrukih razblaženja, tako da je dobijen raspon početnih koncentracija ekstrakta 0.078-10.0 mg/mL. Iste početne koncentracije korišćene su i za standardne antioksidante BHA i BHT. Sve radne probe i kontrole rađene su u tri ponavljanja.

Pripremljeni su rastvori prikazani u *Tabeli 3.5.*, a njihova apsorbancija je merena spektrofotometrijski (515 nm) nakon 60 min uz razvijanje boje u mraku.

*Tabela 3.5.* Rastvori pripremljeni za određivanje neutralizacije DPPH<sup>•</sup> radikala

Radna proba	Korekcija	Kontrola	Slepa proba
100 µL 90 µmol/L DPPH <sup>•</sup>	100 µL MeOH	100 µL 90 µmol/L DPPH <sup>•</sup>	100 µL MeOH
10 µL ekstrakt	10 µL ekstrakt	10 µL rastvarač (80% MeOH)	10 µL rastvarač (80% MeOH)
190 µL MeOH	190 µL MeOH	190 µL MeOH	190 µL MeOH

Iz razlike apsorbancije radne probe ( $A_{rp}$ ) i korekcije ( $A_{kor}$ ) izračunate su apsorbancije ( $A$ ) za svaku koncentraciju ispitivanog ekstrakta:

$$A = A_{rp} - A_{kor}$$

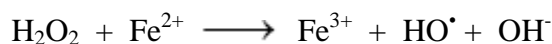
Kapacitet „hvatanja“ slobodnih (DPPH<sup>•</sup>) radikala (RSC, *radical scavenging capacity*) ekstrakata različitih koncentracija ( $RSC_{DPPH}$ ) je računat na osnovu sledeće jednačine, gde je  $A_{kon}$  apsorbancija kontrolne, a  $A_{sp}$  apsorbancija slepe probe:

$$RSC_{DPPH}^{\bullet} (\%) = (1 - A/(A_{kon} - A_{sp})) \times 100\%$$

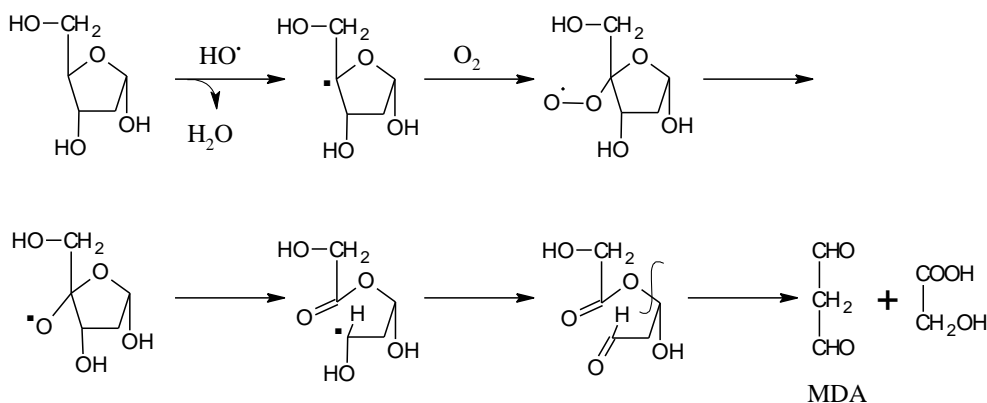
Na osnovu  $RSC_{DPPH}^{\bullet}$  vrednosti određene su  $IC_{50}$  vrednosti (koncentracija pri kojoj je neutralisano 50% radikala) očitavanjem sa odgovarajućeg grafika (funkcija  $RSC_{DPPH}^{\bullet} (\%)$  u zavisnosti od radne koncentracije), a rezultat je izražen kao srednja vrednost tri određene  $IC_{50}$  vrednosti  $\pm$  standardna devijacija ( $\mu\text{g/mL}$ ).

### 3.3.2. Određivanje kapaciteta „hvatanja“ HO<sup>•</sup> radikala

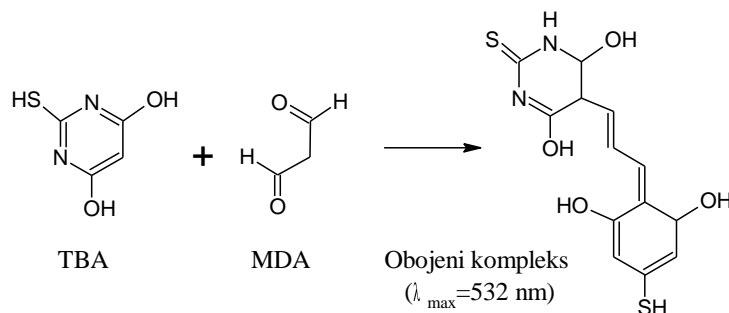
U cilju određivanja kapaciteta „hvatanja“ HO<sup>•</sup> radikala, primenjena je modifikovana metoda Gutteridge-a (1987). Fentonovim reakcionim sistemom generisani su hidroksil radikali:



Nastali reaktivni  $\text{HO}^\bullet$  u prisustvu 2-deoksiriboze i kiseonika grade malonildialdehid (Slika 3.3.), koji se zatim određuje TBA (tiobarbiturna kiselina) testom. TBA test je zasnovan na spektrofotometrijskom određivanju ružičasto obojenog kompleksa koji nastaje nakon reakcije malonildialdehida (MDA) sa dva molekula TBA (Slika 3.4.).



Slika 3.3. Reakcija nastajanja malonildialdehida



Slika 3.4. Reakcija TBA i MDA

#### Reagensi:

1. 0.0147%  $\text{H}_2\text{O}_2$ : pripremljen je dopunjavanjem 42  $\mu\text{L}$  35%  $\text{H}_2\text{O}_2$  do 100.0 mL  $\text{dH}_2\text{O}$
2. 10.0 mmol/L  $\text{FeSO}_4$ : 0.1390 g  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$  rastvoreno u 50.0 mL  $\text{dH}_2\text{O}$
3. 0.05 mol/L 2-deoksiriboza: 0.1677 g 2-deoksiriboze rastvoreno u 25.0 mL fosfatnog pufera pH 7.4
4. 0.067 mol/L fosfatni pufer pH 7.4: 1.7506 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i 7.6851 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  rastvoreno u 1000.0 mL  $\text{dH}_2\text{O}$
5. 0.0372 g/mL EDTA: 1.86 g EDTA rastvoreno u 50.0 mL  $\text{dH}_2\text{O}$
6. TBA reagens: 3.0 g TBA , 120.0 g TCA i 10.4 mL  $\text{HClO}_4$  rastvoreno u 800.0 mL  $\text{dH}_2\text{O}$
7. Početne koncentracije ekstrakata: 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 75.0, 150.0 mg/mL ili 12.5, 25.0, 50.0, 100.0, 150.0, 200.0 mg/mL

8. Početne koncentracije standarda BHA i BHT: 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0, 150.0 mg/mL

**Postupak:**

Od ekstrakta početne koncentracije 0.2 g/mL napravljena je serija šest rastvora razblaženja, tako da je dobijen raspon početnih koncentracija ekstrakta 5-150 mg/mL. Standardni antioksidanti BHA i BHT korišćeni su u rasponu koncentracije 1.56-150.0 mg/mL. Sve radne probe i kontrole rađene su u tri ponavljanja.

Pripremljeni su odgovarajući rastvori (*Tabela 3.6.*) i inkubirani 60 min na 37°C. Nakon dodatka 3.72% EDTA i TBA reagensa, smeša je zagrevana 10 min na 100 °C, a zatim ohlađena do sobne temperature. Svaka proba (0.2 mL) preneti je u mikro ploču, a apsorbancija rastvora je merena spektrofotometrijski na 532 nm.

*Tabela 3.6.* Rastvori pripremljeni za određivanje kapaciteta „hvatanja“ HO<sup>•</sup> radikala

Radna proba	Korekcija	Kontrola
100 µL 0.05 mmol/L 2-deoksiriboza	3.0 mL pufer pH 7.4	100 µL 0.05 mmol/L 2-deoksiriboza
20 µL ekstrakt	20 µL ekstrakt*	20 µL 80% MeOH
100 µL 0.0147% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		100 µL 0.0147% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
100 µL 10.0 mmol/L FeSO <sub>4</sub>		100 µL 10.0 mmol/L FeSO <sub>4</sub>
2.7 mL pufer pH 7.4		2.7 mL pufer pH 7.4
<i>Inkubacija 60 min na 37°C</i>		
200 µL 3.72% EDTA	200 µL 3.72% EDTA	200 µL 3.72% EDTA
2.0 mL TBA reagens	2.0 mL TBA reagens	2.0 mL TBA reagens
<i>Zagrevanje 10 min na 100°C</i>		

\* 20 µL 80% MeOH za korekciju kontrole

Iz razlike apsorbancije radne probe ( $A_{rp}$ ) i korekcije ( $A_{kor}$ ) izračunate su apsorbancije ( $A$ ) za svaku koncentraciju ispitivanog ekstrakta:

$$A = A_{rp} - A_{kor}$$

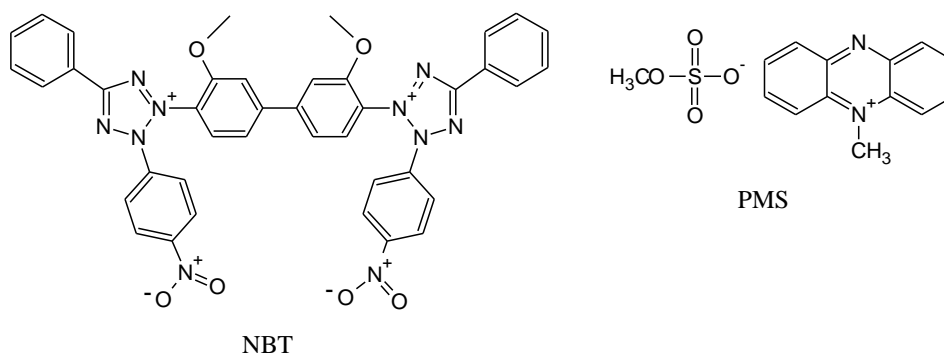
Kapacitet „hvatanja“ HO<sup>•</sup> radikala ( $RSC_{HO^{\bullet}}$ ) ispitanih ekstrakata različitih koncentracija računat je na osnovu sledeće jednačine, gde je  $A_{kon}$  apsorbancija kontrolne probe:

$$RSC_{HO^{\bullet}} (\%) = (1 - A / (A_{kon} - A_{korkon})) \times 100\%$$

Na osnovu  $RSC_{HO\cdot}$  vrednosti određene su  $IC_{50}$  vrednosti (koncentracija pri kojoj je neutralisano 50% radikala) očitavanjem sa odgovarajućeg grafika (funkcija  $RSC_{HO\cdot}$  (%) u zavisnosti od radne koncentracije), a rezultat je izražen kao srednja vrednost tri određene  $IC_{50}$  vrednosti  $\pm$  standardna devijacija ( $\mu\text{g/mL}$ ).

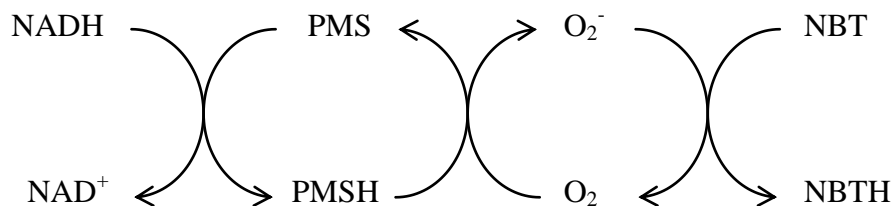
### 3.3.3. Određivanje kapaciteta „hvatanja“ $O_2^{\cdot-}$ radikala

Kapacitet „hvatanja“ superoksid anjon radikala ispitivanih ekstrakata određen je merenjem njihove sposobnosti da neutrališu  $O_2^{\cdot-}$  nastale tokom aerobne redukcije nitroblu-tetrazolijum nitro-plavog (NBT, *Slika 3.5.*) pomoću NADH u prisustvu fenazinmetilsulfata (PMS, *Slika 3.5.*; Nishikimi, 1972).



*Slika 3.5.* Strukturne formule tetrazolijum nitro-plavog i fenazinmetilsulfata

Stepen redukcije NBT sa NADH u aerobnim uslovima je zanemarljiv (5%) i linearno raste sa količinom dodatog PMS. PMS se ponaša kao prenosilac elektrona i znatno utiče na mehanizam redukcije. S obzirom da je strukturno sličan flavinu, PMS u reakciji sa NADH prelazi u redukovani oblik, PMSH. Tokom njegove reoksidacije kiseonikom iz vazduha dolazi do generisanja superoksid anjon radikala ( $O_2^{\cdot-}$ ) koji u velikoj meri (95%) redukuje NBT u formazan (Nishikimi, 1972; *Slika 3.6.*).



*Slika 3.6.* Mehanizam aerobne redukcije NBT

NBT je u oksidovanom obliku bezbojan, a redukcijom prelazi u NBTH koji je plave boje. Dodatkom ekstrakta koji sadrži fenolna jedinjenja dolazi do neutralizacije  $O_2^{\bullet-}$  radikala i smanjenja redukcije NBT reagensa. Količina neutralisanih radikala prati se spektrofotometrijski i proporcionalna je smanjenju intenziteta obojenja.

### **Reagensi:**

1. 144  $\mu\text{mol/L}$  nitroblu-tetrazolijum: 0.0031 g NBT rastvoreno u 25.0 mL  $\text{dH}_2\text{O}$
2. 600  $\mu\text{mol/L}$  fenazinmetilsulfat - osnovni rastvor PMS reagensa: 0.0046 g PMS rastvoreno u 25 mL  $\text{dH}_2\text{O}$  (rastvor čuvan u tamnoj boci)
3. 60  $\mu\text{mol/L}$  fenazinmetilsulfat - radni rastvor PMS reagensa: 0.25 mL osnovnog rastvora PMS dodato u 2.25 mL  $\text{dH}_2\text{O}$  (rastvor pripremljen neposredno pre merenja)
4. 677  $\mu\text{mol/L}$  NADH: 0.0048 g NADH rastvoreno u 10.0 mL  $\text{dH}_2\text{O}$
5. 0.017 mol/L fosfatni pufer pH 8.3: 0.9321 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  i 0.0182 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  rastvoreno u 100.0 mL  $\text{dH}_2\text{O}$
6. Početne koncentracije ekstrakata: 0.62, 1.25, 2.50, 5.0, 10.0, 15.0 i 20.0 mg/mL ili 0.50, 1.0, 3.0, 5.0, 8.0, 10.0 i 12.0 mg/mL ili 0.25, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 8.0, 10.0 mg/mL
7. Početne koncentracije BHA i BHT: 0.62, 1.25, 2.50, 5.0, 10.0, 15.0 i 20.0 mg/mL

### **Postupak:**

Od ekstrakata početne koncentracije 0.2 g/mL napravljene su serije sedam rastvora razblaženja, tako da je dobijen raspon početnih koncentracija ekstrakta 0.62-20.0 mg/mL, odnosno 0.5-12.0 mg/mL. Standardni antioksidanti BHA i BHT korišćeni su u rasponu koncentracije 0.62-20.0 mg/mL. Sve radne probe i kontrole rađene su u tri ponavljanja.

Pripremljeni su odgovarajući rastvori (Tabela 3.7.), a njihova apsorbancija je merena (560 nm) nakon 5 min.

Tabela 3.7. Rastvori pripremljeni za određivanje kapaciteta „hvatanja“  $O_2^{\bullet-}$  radikala

Radna proba	Korekcija	Kontrola
200 $\mu\text{L}$ 144 $\mu\text{mol/L}$ NBT	1.5 mL pufer pH 8.3	200 $\mu\text{L}$ 144 $\mu\text{mol/L}$ NBT
10 $\mu\text{L}$ ekstrakt	10 $\mu\text{L}$ ekstrakt	10 $\mu\text{L}$ 80% MeOH
100 $\mu\text{L}$ 677 $\mu\text{mol/L}$ NADH*		100 $\mu\text{L}$ 677 $\mu\text{mol/L}$ NADH*
100 $\mu\text{L}$ 60 $\mu\text{mol/L}$ PMS*		100 $\mu\text{L}$ 60 $\mu\text{mol/L}$ PMS*
1.1 mL pufer pH 8.3		1.1 mL pH pufer 8.3

\*rastvori dodati neposredno jedan za drugim



Iz razlike apsorbancije radne probe ( $A_{rp}$ ) i korekcije ( $A_{kor}$ ) izračunate su apsorbancije ( $A$ ) za svaku koncentraciju ispitivanog ekstrakta:

$$A = A_{rp} - A_{kor}$$

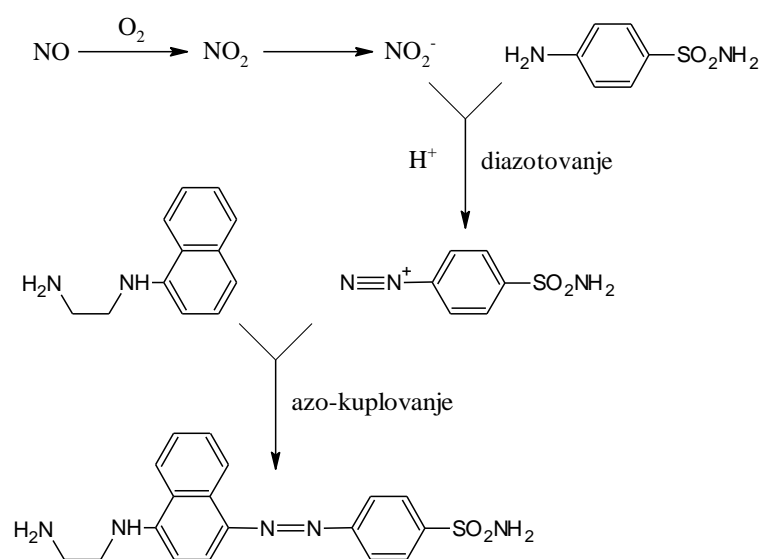
Kapacitet „hvatanja“  $O_2^{\bullet-}$  radikala ( $RSC_{O_2^{\bullet-}}$ ) ispitanih ekstrakata različitih koncentracija računat je na osnovu sledeće jednačine, gde je  $A_{kon}$  apsorbancija kontrolne probe:

$$RSC_{O_2^{\bullet-}} (\%) = (1 - A/A_{kon}) \times 100\%$$

Na osnovu  $RSC_{O_2^{\bullet-}}$  vrednosti određene su  $IC_{50}$  vrednosti (koncentracija pri kojoj je neutralisano 50% radikala) očitavanjem sa odgovarajućeg grafika (funkcija  $RSC_{O_2^{\bullet-}} (\%)$  u zavisnosti od radne koncentracije), a rezultat je izražen kao srednja vrednost tri određene  $IC_{50}$  vrednosti  $\pm$  standardna devijacija ( $\mu g/mL$ ).

### 3.3.4. Određivanje kapaciteta „hvatanja“ $NO^{\bullet}$ radikala

Određivanje kapaciteta „hvatanja“  $NO^{\bullet}$  radikala metanolnih ekstrakata vrsta roda *Plantago* zasniva se na spektrofotometrijskom merenju neutralizacije generisanih nitritnih jona. U ovu svrhu korišćen je vodeni rastvor SNP koji predstavlja izvor  $NO^{\bullet}$  radikala pri fiziološkom pH. Nastali  $NO^{\bullet}$  reaguje sa kiseonikom dajući nitritne jone, čija koncentracija se određuje po metodi Green-a i saradnika (1982), a koja se zasniva na spektrofotometrijskom određivanju purpurno-ružičastog diazo kompleksa koji nastaje nakon reakcije  $NO_2^-$  i Griees-ovog reagensa na sobnoj temperaturi (Slika 3.7.).



Slika 3.7. Nastajanje diazo kompleksa

**Reagensi:**

1. 10 mmol/L natrijum-nitroprusid (SNP): 0.2980 g SNP rastvoreno u 100.0 mL fosfatnog pufera pH 7.4
2. Griess-ov reagens: dobija se mešanjem jednakih zapremina rastvora **A** i **B**:  
**A:** 0.2% rastvor N-(1-naftil)-etilendiamin dihidrohlorida (NEDA): 0.5 g NEDA rastvoreno u 249.5 mL dH<sub>2</sub>O  
**B:** 2% rastvor sulfanilamida (SA) u 4% fosfatnoj kiselini: 5 g SA rastvoreno u smeši 235.2 mL dH<sub>2</sub>O i 5.80 mL H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>  
*Napomena:* Smeša je stabilna 12 h na 4°C dok su pojedinačni rastvori stabilni 4 meseca.
3. 0.067 mol/L fosfatni pufer pH 7.4: 1.7506 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> i 7.6851 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> rastvoreno u 1000.0 mL dH<sub>2</sub>O
4. Početne koncentracije ekstrakata: 15.0, 25.0, 50.0, 75.0, 100.0, 150.0 i 200.0 mg/mL
5. Početne koncentracije BHA i BHT: 15.0, 25.0, 50.0, 75.0, 100.0, 150.0 i 200.0 mg/mL

**Postupak:**

Od ekstrakata početne koncentracije 0.2 g/mL napravljene su serije sedam rastvora razblaženja, tako da je dobijen raspon početnih koncentracija ekstrakta 15.0-200.0 mg/mL. Standardni antioksidanti BHA i BHT korišćeni su u istom rasponu koncentracije. Sve radne probe i kontrole rađene su u tri ponavljanja.

Pripremljeni su odgovarajući rastvori (*Tabela 3.8.*), a njihova apsorbancija je merena (546 nm) nakon 90 min.

*Tabela 3.8.* Rastvori pripremljeni za određivanje kapaciteta „hvatanja“ NO<sup>•</sup> radikala

Radna proba	Korekcija	Kontrola
0.5 mL 10 mmol/L SNP	1.0 mL pufer pH 7.4	0.5 mL 10 mmol/L SNP
30 µL ekstrakt	30 µL ekstrakt	30 µL 80% MeOH
0.5 mL pufer pH 7.4		0.5 mL pufer pH 7.4
<i>Inkubacija 90 min na 25°C (konstantno svetlo)</i>		
1 mL Griess-ov reagens	1 mL Griess-ov reagensa	1 mL Griess-ov reagens

*Napomena:* svi reagensi su dodati u mraku

Iz razlike apsorbancije radne probe ( $A_{rp}$ ) i korekcije ( $A_{kor}$ ) izračunate su apsorbancije ( $A$ ) za svaku koncentraciju ispitivanog ekstrakta:

$$A = A_{rp} - A_{kor}$$

Kapacitet „hvatanja“ azot(II)-oksida ( $RSC_{NO^\bullet}$ ) ispitanih ekstrakata različitih koncentracija računat je na osnovu sledeće jednačine, gde je  $A_{kon}$  apsorbancija kontrolne probe:

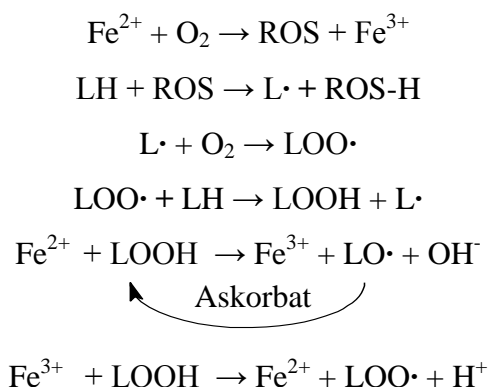
$$RSC_{NO^\bullet} (\%) = (1 - A/A_{kon}) \times 100\%$$

Na osnovu  $RSC_{NO^\bullet}$  vrednosti određene su  $IC_{50}$  vrednosti (koncentracija pri kojoj je neutralisano 50% radikala) očitavanjem sa odgovarajućeg grafika (funkcija  $RSC_{NO^\bullet} (\%)$  u zavisnosti od radne koncentracije), a rezultat je izražen kao srednja vrednost tri određene  $IC_{50}$  vrednosti  $\pm$  standardna devijacija (mg/mL).

### 3.3.5. Određivanje inhibicije lipidne peroksidacije

Određivanje sposobnosti ispitivanih ekstrakata da inhibiraju lipidnu peroksidaciju urađeno je TBA metodom (Halliwell i Gutteridge, 1986), pri čemu su polinezasićene masne kiseline iz lanenog ulja dobijene ekstrakcijom po Soxlet-u korišćene kao supstrat za lipidnu peroksidaciju, izazvanu  $Fe^{2+}$  jonima u sinergizmu sa askorbatom.

Tačan mehanizam inicijacije lipidne peroksidacije  $Fe^{2+}$  jonima nije u potpunosti razjašnjen. Poznato je da  $Fe^{2+}$  joni mogu reagovati sa kiseonikom iz vazduha i pri tom generisati reaktivne kiseonične vrste (ROS), kao npr. superoksid anjon ( $O_2^{\bullet-}$ ), za koji se pretpostavlja da je inicijator lančane radikalske reakcije lipidne peroksidacije (Slika 3.8.).



Slika 3.8. Lipidna peroksidacija masnih kiselina indukovana sistemom  $Fe^{2+}$ /askorbinska kiselina

Inicijalna reakcija kiseoničnog radikala sa polinezasićenom masnom kiselinom (LH) vodi nastajanju lipidnog radikala ( $L^{\bullet}$ ), koji zatim reaguje sa kiseonikom i gradi peroksil radikal ( $LOO^{\bullet}$ ). Nastali  $LOO^{\bullet}$  može reagovati sa sledećim molekulom LH dajući novi lipidni radikal i lipidni hidroperoksid (LOOH). LOOH u reakciji sa redukovanim metalima, kao npr.  $Fe^{2+}$  ili  $Cu^{2+}$ , daje lipidni alkoksi radikal ( $LO^{\bullet}$ ), koji, kao i  $LOO^{\bullet}$ , vrši dalju propagaciju lančane peroksidacije. Nastalih oksidovani metali ( $Fe^{3+}$  ili  $Cu^{3+}$ ) redukuju se u prisustvu askorbinske kiseline ili u reakciji sa LOOH, pri čemu ponovo nastaje slobodni peroksil radikal. Takođe, često u prisustvu  $Fe^{2+}$  i askorbinske kiseline, može doći do razgradnje LOOH do reaktivnih aldehidnih proizvoda, kao što su malondialdehid (MDA), 4-hidroksi-2-nonenal (HNE), 4-hidroksi-2-heksenal (4-HHE), akrolein itd. Krajnji produkt lipidne peroksidacije, MDA može da reaguje sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA), pri čemu nastaje obojeni kompleks čija se apsorbancija može meriti spektrofotometrijski na 532 nm (*Slika 3.4.*).

**Reagensi:**

1. Laneno ulje: dobijeno iz lana ekstrakcijom po Soxlet-u
2. 0.035% rastvor masnih kiselina (MK): 35  $\mu$ L lanenog ulja i 250  $\mu$ L Tween-80 rastvoreno u 100.0 mL fosfatnog pufera pH 7.4 (ultrazvučno kupatilo, 90 min)
3. 4.58 mmol/L  $FeSO_4$ : 0.0127 g  $FeSO_4 \times 7 H_2O$  rastvoreno u 10.0 mL  $dH_2O$
4. 3.49 mmol/L Askorbinska kiselina - osnovni rastvor: 0.0615 g askorbinske kiseline rastvoreno u 100.0 mL  $dH_2O$
5. 0.087 mmol/L askorbinska kiselina - radni rastvor: 10  $\mu$ L osnovnog rastvora 3.49 mmol/L askorbinske kiseline pomešano sa 390  $\mu$ L  $dH_2O$
6. 3.72% EDTA: 1.86 g EDTA rastvoreno u 50.0 mL  $dH_2O$
7. 0.067 mol/L fosfatni pufer pH 7.4: 1.7506 g  $KH_2PO_4$  i 7.6851 g  $Na_2HPO_4$  rastvoreno u 1000.00 mL  $dH_2O$
8. TBA reagens: 3.0 g TBA, 120.0 g TCA i 10.4 mL  $HClO_4$  rastvoreno u 800.0 mL  $dH_2O$
9. Početne koncentracije ekstrakata: 0.62, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 mg/mL ili 10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 100.0, 200 mg/mL
10. Početne koncentracije standarda BHA i BHT: 0.62, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 mg/mL

**Postupak:**

Od ekstrakta početne koncentracije 0.2 g/mL napravljena je serija šest rastvora razblaženja, tako da je dobijen raspon početnih koncentracija ekstrakta 0.62-20.0 mg/mL. Standardni antioksidanti BHA i BHT korišćeni su u istom rasponu koncentracije. Sve radne probe i kontrole rađene su u tri ponavljanja.

Pripremljeni su odgovarajući rastvori (Tabela 3.9.), i inkubirani 60 min na 37°C. Nakon dodatka 3.72% EDTA i TBA reagensa, smeša je zagrevana 15 min na 100 °C, a zatim ohlađena do sobne temperature i centrifugirana tokom 15 min na 3500 o/min. Apsorbancija rastvora je merena spektrofotometrijski na 532 nm.

*Tabela 3.9. Rastvori pripremljeni za određivanje inhibicije lipidne peroksidacije*

Radna proba	Korekcija	Kontrola
3.0 mL 0.035% rastvor MK	3.04 mL pufer pH 7.4	3.0 mL 0.035% rastvor MK
20 µL 4.58 mmol/L FeSO <sub>4</sub>	20 µL ekstrakt*	20 µL 4.58 mmol/L FeSO <sub>4</sub>
20 µL 0.087 mmol/L askorbat		20 µL 0.087 mmol/L askorbat
20 µL ekstrakt		20 µL 80% MeOH
<i>Inkubacija 60 min na 37°C</i>		
200 µL 3.72% EDTA	200 µL 3.72% EDTA	200 µL 3.72% EDTA
2.0 mL TBA reagens	2.0 mL TBA reagens	2.0 mL TBA reagens
<i>Zagrevanje 15 min na 100°C</i>		
<i>Centrifugiranje 15 min na 3500 o/min</i>		

\* 20 µL 80% MeOH za korekciju kontrole

Iz razlike apsorbancije radne probe ( $A_{rp}$ ) i korekcije ( $A_{kor}$ ) izračunate su apsorbancije ( $A$ ) za svaku koncentraciju ispitivanog ekstrakta:

$$A = A_{rp} - A_{kor}$$

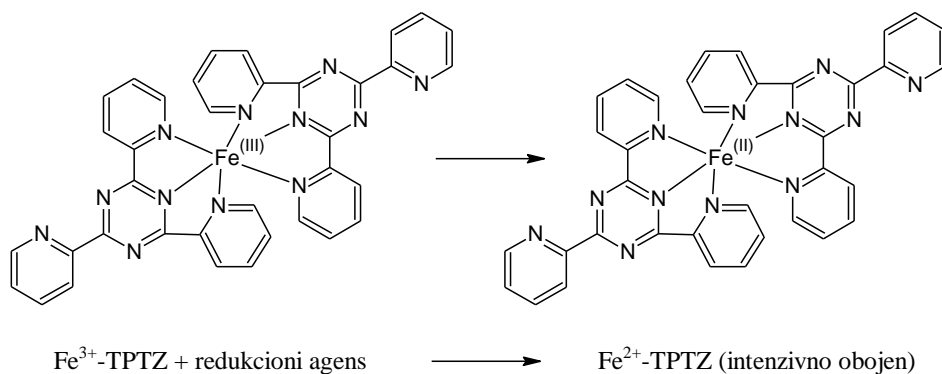
Inhibicija lipidne peroksidacije ekstrakata različitih koncentracija ( $I_{LP}$ ) je računata na osnovu sledeće jednačine, gde je  $A_{kon}$  apsorbancija kontrolne probe:

$$I_{LP} (\%) = (1 - A/(A_{kon} - A_{korkon})) \times 100\%$$

Na osnovu  $I_{LP}$  vrednosti određene su  $IC_{50}$  vrednosti (koncentracija pri kojoj je neutralisano 50% radikala) očitavanjem sa odgovarajućeg grafika (funkcija  $I_{LP} (\%)$  u zavisnosti od radne koncentracije), a rezultat je izražen kao srednja vrednost tri određene  $IC_{50}$  vrednosti  $\pm$  standardna devijacija ( $\mu\text{g/mL}$ ).

### 3.3.6. Određivanje redukcionog potencijala (FRAP test)

Određivanje redukcionog potencijala ispitivanih ekstrakata urađeno je po metodi Benzie-a i Strain-a (1996), prilagođenoj za mikro ploče. Na niskoj pH vrednosti, može doći do redukcije gvožđe(III)-2,4,5-tripiridil-s-triazin kompleksa u obojeni gvožđe(II)-2,4,5-tripiridil-s-triazin kompleks, čija se apsorbancija može meriti spektrofotometrijski na 593 nm (Slika 3.9.).



Slika 3.9. Reakcija primenjena u FRAP testu

#### Reagensi:

1. 10.0 mmol/L 2,4,5-tripiridil-s-triazin (TPTZ) u 40 mmol/L HCl: 0.0156 g TPTZ rastvoreno u smeši 4.993 g dH<sub>2</sub>O i 0.017 mL 36% HCl
2. 0.02 mol/L FeCl<sub>3</sub>: 0.0270 g FeCl<sub>3</sub> × 6 H<sub>2</sub>O rastvoreno u 5.0 mL dH<sub>2</sub>O
3. Acetatni pufer pH 3.6: 0.1550 g CH<sub>3</sub>COONa × 3 H<sub>2</sub>O i 0.80 mL glac. CH<sub>3</sub>COOH dopunjeno do 50 mL dH<sub>2</sub>O
4. FRAP reagens: 10.0 mmol/L TPTZ : 0.02 mol/L FeCl<sub>3</sub> : acetatni pufer pH 3.6 pomešani u odnosu 5:5:50 neposredno pre merenja
5. 200 µg/mL askorbinska kiselina: 0.05 g askorbinske kiseline rastvoreno u 250.0 mL dH<sub>2</sub>O

Razblaženja askorbinske kiseline za standardnu krivu data su u Tabeli 3.10.:

Tabela 3.10. Razblaženja askorbinske kiseline korišćena za izradu standardne krive

Početna koncentracija askorbata ( $\mu\text{g/mL}$ )	160	140	120	100	80	60	40	20	10	5	2.5	1.25
Zapremina osnovnog rastvora 200 $\mu\text{g/mL}$ askorbata ( $\mu\text{L}$ )	160	140	120	100	80	60	40	20	10	10	100*	100*
Zapremina $\text{dH}_2\text{O}$ ( $\text{mL}$ )	40	60	80	100	120	140	160	180	190	390	100	300

\*koncentracije 5  $\mu\text{g/mL}$ 

6. Početne koncentracije ekstrakata i standarda BHT: 0.5, 1.0 i 2.0  $\text{mg/mL}$  (ekstrakti) i

### Postupak:

Razblaženja askorbinske kiseline za standardnu krivu su napravljena u rasponu koncentracije od 1.25 do 160.0  $\mu\text{g/mL}$ . Osnovni rastvor ekstrakata razblažen je do početnih koncentracija od 0.5, 1.0 i 2.0  $\text{mg/mL}$ . Sve radne probe rađene su u tri ponavljanja. Pripremljeni su rastvori prikazani u Tabeli 3.11., a njihova apsorbancija merena je spektrofotometrijski (593 nm) nakon šest minuta.

Tabela 3.11. Rastvori pripremljeni za određivanje redukcionog potencijala

Radna proba	Korekcija	Slepa proba	Korekcija slepe probe
290 $\mu\text{L}$ FRAP reagens	290 $\mu\text{L}$ $\text{dH}_2\text{O}$	290 $\mu\text{L}$ FRAP reagens	290 $\mu\text{L}$ $\text{dH}_2\text{O}$
10 $\mu\text{L}$ ekstrakt	10 $\mu\text{L}$ ekstrakt	10 $\mu\text{L}$ 80% MeOH	10 $\mu\text{L}$ 80% MeOH

Iz razlike apsorbancije srednje vrednosti radnih proba ( $A_{\text{sr}}$ ) i korekcije ( $A_{\text{kor}}$ ) i slepe probe ( $A_{\text{sp}}$ ) i korekcije slepe probe ( $A_{\text{korsp}}$ ) izračunate su apsorbancije ( $A$ ) za svaki ispitani ekstrakt:

$$A = (A_{\text{sr}} - A_{\text{kor}}) - (A_{\text{sp}} - A_{\text{korsp}})$$

Redukcioni potencijal je izračunat na osnovu kalibracione krive (funkcija apsorbancije u zavisnosti od koncentracije) standardnog rastvora askorbinske kiseline. Rezultat je izražen kao srednja vrednost tri merenja  $\pm$  standardna devijacija (miligram-ekvivalenata askorbinske kiseline po gramu suvog ekstrakta).

### 3.3.7. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola određen je po spektrofotometrijskoj metodi Singleton-a i saradnika (1999), prilagođenoj za mikro ploče. Ova metoda se zasniva na osobini fenola da u reakciji sa Folin-Ciocalteu-ovim reagensom (smeša  $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  i  $\text{LiSO}_4$ ) daju obojeni kompleks, čija apsorbancija se meri na 760 nm.

#### Reagensi:

1. 0.1 mol/L Folin-Ciocalteu reagens (FC reagens): 1.25 mL 2M FC reagensa razblaženo destilovanom vodom do 25.0 mL
2. 75 g/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ : 1.875 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  rastvoreno u 25.0 mL  $\text{dH}_2\text{O}$
3. 1 mg/mL Galna kiselina: 0.0276 g galne kiseline  $\times$  1  $\text{H}_2\text{O}$  rastvoreno u 25.0 mL  $\text{dH}_2\text{O}$   
Razblaženja galne kiseline za standardnu krivu data su u *Tabeli 3.12.*:

*Tabela 3.12.* Razblaženja galne kiseline korišćena za izradu standardne krive

Početna koncentracija galne kis. ( $\mu\text{g/mL}$ )	100	80	60	50	40	30	20	10	5	2.5	1.25	0
Zapremina osnovnog rastvora 1 mg/mL galne kiseline (mL)	50	40	30	25	20	15	10	10	10	10	10	0
Zapremina vode (mL)	450	460	470	475	480	485	490	990	1990	3990	7990	500

4. Početne koncentracije ekstrakata: 125, 250 i 500  $\mu\text{g/mL}$

#### Postupak:

Razblaženja galne kiseline za standardnu krivu su napravljena u rasponu koncentracije od 1.25 do 100  $\mu\text{g/mL}$ . Osnovni rastvor ekstrakata razblažen je do početnih koncentracija od 125, 250 i 500  $\mu\text{g/mL}$ . Sve radne probe rađene su u tri ponavljanja. Pripremljeni su rastvori prikazani u *Tabeli 3.13.*, a njihova apsorbancija merena je spektrofotometrijski (760 nm) nakon dva časa.



Tabela 3.13. Rastvori pripremljeni za određivanje sadržaja ukupnih fenola

Radna proba	Korekcija	Slepa proba	Korekcija slepe probe
30 µL ekstrakt	30 µL ekstrakt	30 µL rastvarač (80% MeOH)	30 µL rastvarač (80% MeOH)
150 µL 0.1 mol/L FC reagens	150 µL dH <sub>2</sub> O	150 µL 0.1 mol/L FC reagens	150 µL dH <sub>2</sub> O
120 µL 75 g/L Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> *	120 µL 75 g/L Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> *	120 µL 75 g/L Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> *	120 µL 75 g/L Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> *

\* rastvor je dodat 10 min po dodatku FC reagensa

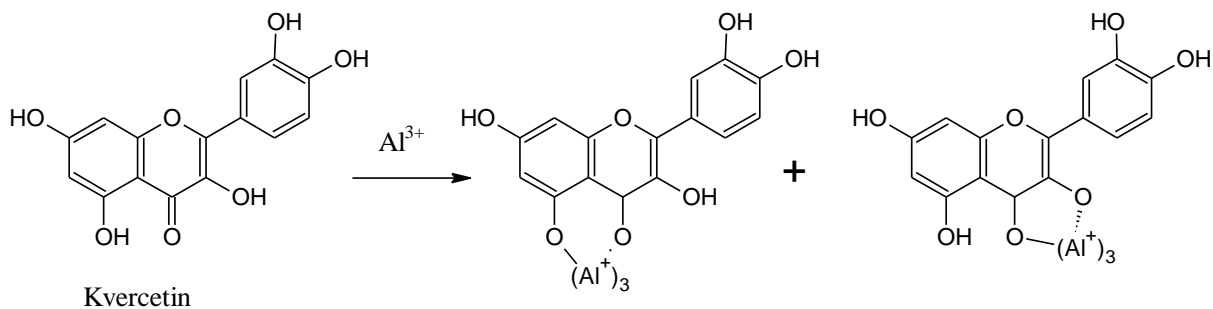
Iz razlike apsorbancije srednje vrednosti radnih proba ( $A_{sr}$ ) i korekcije ( $A_{kor}$ ) i slepe probe ( $A_{sp}$ ) i korekcije slepe probe ( $A_{korsp}$ ) izračunate su apsorbancije ( $A$ ) za svaki ispitani ekstrakt:

$$A = (A_{sr} - A_{kor}) - (A_{sp} - A_{korsp})$$

Sadržaj fenola je izračunat na osnovu kalibracione krive (funkcija apsorbancije u zavisnosti od koncentracije) standardnog rastvora galne kiseline. Rezultat je izražen kao srednja vrednost tri merenja  $\pm$  standardna devijacija (miligram-ekvivalenata galne kiseline po gramu suvog ekstrakta).

### 3.3.8. Određivanje sadržaja flavonoida

Sadržaj flavonoida određen je po spektrofotometrijskoj metodi Chang-a i saradnika (2002), prilagođenoj za mikro ploče. Naime, flavonoidi i flavonglikozidi daju sa metalima odgovarajuće metalokomplekse. Naročito je značajan Al-kompleks (Slika 3.10.), jer se  $Al^{3+}$  vezuje za ukupne flavonoide pa se sumarni apsorpcioni maksimum lako određuje.

Slika 3.10. Nastajanje obojenog kompleksa  $Al^{3+}$  jona i flavonoida

**Reagensi:**

1. 0.75 mol/L  $\text{AlCl}_3$ : 4.5266 g  $\text{AlCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$  rastvoreno u 25.0 mL  $\text{dH}_2\text{O}$
2. 1 mol/L  $\text{CH}_3\text{COONa}$ : 3.402 g  $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3 \text{ H}_2\text{O}$  rastvoreno u 25.0 mL  $\text{dH}_2\text{O}$
3. 1 mg/mL Kvercetin: 0.0264 g kvercetin  $\times \text{H}_2\text{O}$  rastvoreno u 25.0 mL 80% metanola

Razblaženja kvercetina za standardnu krivu data su u *Tabeli 3.14.*:

*Tabela 3.14.* Razblaženja galne kiseline korišćena za izradu standardne krive

Početna koncentracija kvercetina ( $\mu\text{g/mL}$ )	100	80	60	50	40	30	20	10	5	2.5	1.25	0
Zapremina osnovnog rastvora 1 mg/mL kvercetina (mL)	50	40	30	25	20	15	10	10	10	10	10	0
Zapremina 80% metanola (mL)	450	460	470	475	480	485	490	990	1990	3990	7990	500

4. Početne koncentracije ekstrakata: 1.0, 2.0 i 4.0 mg/mL

**Postupak:**

Razblaženja kvercetina za standardnu krivu su napravljena u rasponu koncentracije od 1.25 do 100  $\mu\text{g/mL}$ . Osnovni rastvor ekstrakata razblažen je do početnih koncentracija od 1.0, 2.0 i 4.0 mg/mL. Sve radne probe rađene su u tri ponavljanja. Pripremljeni su rastvori prikazani u *Tabeli 3.15.*, a njihova apsorbancija merena je spektrofotometrijski (415 nm) nakon trideset minuta.

*Tabela 3.15.* Rastvori pripremljeni za određivanje sadržaja flavonoida

Radna proba	Korekcija	Slepa proba	Korekcija slepe probe
30 $\mu\text{L}$ ekstrakt	30 $\mu\text{L}$ ekstrakt	30 $\mu\text{L}$ rastvarač (80% MeOH)	30 $\mu\text{L}$ rastvarač (80% MeOH)
90 $\mu\text{L}$ MeOH	90 $\mu\text{L}$ MeOH	90 $\mu\text{L}$ MeOH	90 $\mu\text{L}$ MeOH
6 $\mu\text{L}$ 0.75 mol/L $\text{AlCl}_3$	6 $\mu\text{L}$ $\text{H}_2\text{O}$	6 $\mu\text{L}$ 0.75 mol/L $\text{AlCl}_3$	6 $\mu\text{L}$ $\text{H}_2\text{O}$
6 $\mu\text{L}$ 1 mol/L $\text{CH}_3\text{COONa}$	6 $\mu\text{L}$ 1 mol/L $\text{CH}_3\text{COONa}$	6 $\mu\text{L}$ 1 mol/L $\text{CH}_3\text{COONa}$	6 $\mu\text{L}$ 1 mol/L $\text{CH}_3\text{COONa}$
170 $\mu\text{L}$ $\text{H}_2\text{O}$	170 $\mu\text{L}$ $\text{H}_2\text{O}$	170 $\mu\text{L}$ $\text{H}_2\text{O}$	170 $\mu\text{L}$ $\text{H}_2\text{O}$

Iz razlike apsorbancije srednje vrednosti radnih proba ( $A_{sr}$ ) i korekcije ( $A_{kor}$ ) i slepe probe ( $A_{sp}$ ) i korekcije slepe probe ( $A_{korsp}$ ) izračunate su apsorbancije ( $A$ ) za svaki ispitani ekstrakt:

$$A = (A_{sr} - A_{kor}) - (A_{sp} - A_{korsp})$$

Sadržaj fenola je izračunat na osnovu kalibracione krive (funkcija apsorbancije u zavisnosti od koncentracije) standardnog rastvora kvercetina. Rezultat je izražen kao srednja vrednost tri merenja  $\pm$  standardna devijacija (miligram-ekvivalenta kvercetina po gramu suvog ekstrakta).

### **3.4. Određivanje antiinflamatornog potencijala**

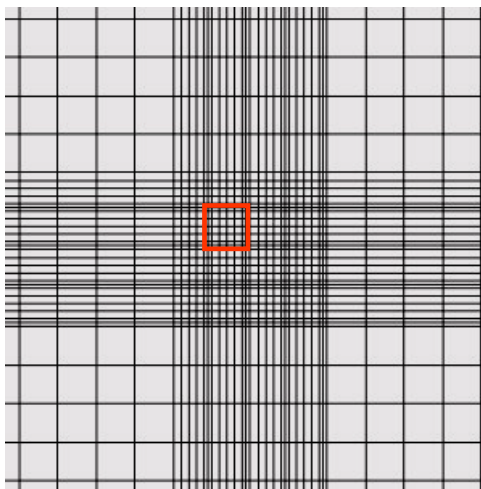
#### **3.4.1. Određivanje broja trombocita**

Trombociti korišćeni u eksperimentu dobijeni su sa Instituta za transfuziju u Novom Sadu. Dobijani trombociti nalazili su se u specijalnim kesama koje predstavljaju koncentrat trombocita. Iako zastareli (nakon 5 dana) za medicinsku upotrebu, trombociti su i dalje vijabilni, samo je njihov broj smanjen. Trombociti se čuvaju uz neprestano blago mešanje na temperaturi od 20°C do 24°C. Tačan broj trombocita određivan je brojanjem u Neubauer-ovoj komori nakon tretiranja trombocita 1% amonijum-oksalamatom, pri čemu se pod mikroskopom vijabilni trombociti uočavaju kao svetlucave čestice.

Rastvor trombocita koji se koristi pri brojanju napravljen je mešanjem 10  $\mu$ L koncentrata trombocita i 990  $\mu$ L 1% rastvora amonijum-oksalata, pri čemu se dobija razblaženje od 100 puta. Pre brojanja, potrebno je da rastvor za brojanje ostoji 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon 10 min, 10  $\mu$ L pripremljenog rastvora nanosi se u Neubauer-ovu komoru, preko označenog mesta, koje je predhodno prekriveno pokrovnim staklom. Nakon nekoliko minuta, kada se trombociti „umire“ brojanje se vrši u centralnom kvadratu u odabranim kvadratićima, najmanje četiri puta, na mikroskopskom uvećanju od 40 puta. Na *Slici 3.11.* prikazana je Neubauer-ova komora pod mikroskopom sa naznačenim jednim kvadratićem u kome se broje trombociti. Po nalasku dobre slike pod mikroskopom se broje trombociti koji svetlucaju. Pri brojanju uzimaju se u obzir trombociti u samom kvadratiću i trombociti koji se nalaze na dve odabrane strane kvadratića (npr. desna i donja strana, ili leva i gornja strana). Isti princip se koristi za svaki kvadratić koji se odabere za brojanje.

Broj trombocita se određuje formulom koja je formirana na osnovu dimenzija komore i razblaženja trombocita. Visina komore iznosi 0.1 mm, dok površina jednog kvadratića u kom se broje trombociti iznosi  $0.04 \text{ mm}^2$ , tako da je zapremina u kojoj se broje trombocita  $4 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$  tj.  $4 \times 10^{-6} \text{ mL}$ . Ako se u formulu uvrsti taj podatak kao i razblaženje, dobija se krajnji izraz:

$$\text{broj trombocita/mL} = (\text{srednja vrednost izbrojanih trombocita} \times \text{razblaženje (100)}) / (4 \times 10^{-6})$$



Slika 3.11. Izgled Neubauer-ovu komore pod mikroskopom  
([www.carl-roth.de](http://www.carl-roth.de))

### 3.4.2. Eksperimentalni postupak za određivanje antiinflamatorne aktivnosti

Određivanje antiinflamatorne aktivnosti ispitivanih ekstrakata i standardnih jedinjenja urađeno je po modifikovanoj metodi Safayhi-a i saradnika (1992). Metoda je zasnovana na određivanju sposobnosti inhibicije enzima ciklooksigenaze-1 i 12-lipooksigenaze u intaktnom ćelijskom sistemu (humanim trombocitima), gde je proces inflamacije izazivan dejstvom kalcijumove jonofore A23184 (kalcimicin).

#### **Reagensi:**

1. Pufer pH 7.2: 4.0033 g NaCl, 0.1006 g KCl, 0.1361 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.8899 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  i 0.450 g glukoza monohidrata rastvoreno je u 500.0 mL  $\text{dH}_2\text{O}$
2. 1.9 mmol/L A23187 (kalcimicin) - osnovni rastvor: 1.0 mg kalcimicina rastvoren u 1.0 mL DMSO
3. 125  $\mu\text{mol/L}$  A23187 (kalcimicin) – radni rastvor: 0.658 mL osnovnog rastvora kalcimicina (1.9 mmol/L) dopunjeno DMSO-m do 10.0 mL

4. 16.66 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ : 0,0186 g  $\text{CaCl}_2$  rastvoreno u 10.0 mL  $\text{dH}_2\text{O}$
5. 1%  $\text{HCOOH}$ : 5 ml cc  $\text{HCOOH}$  pomešano sa 495.0 mL  $\text{dH}_2\text{O}$
6. 0.1 mg/mL  $\text{PGB}_2$  - osnovni rastvor: 1.0 mg  $\text{PGB}_2$  rastvoren u 10.0 mL DMSO
7. 6  $\mu\text{g/mL}$   $\text{PGB}_2$  - radni rastvor: 0.6 mL osnovnog rastvora  $\text{PGB}_2$  dopunjeno DMSO-m do 10.0 mL
8. 1%  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ : 1.1450 g  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  rastvoreno u 100.0 mL  $\text{dH}_2\text{O}$
9. Početne koncentracije ekstrakata i standarda: 10.0, 25.0, 50.0, 100.0, 150.0 i 200.0 mg/mL (ekstrakti); 0.156, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5 i 5 mg/mL (kvercetin); 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.3 i 0.6 mg/mL (aspirin).

**Postupak:**

Od ekstrakta početne koncentracije 0.2 g/mL (DMSO) napravljena je serija šest rastvora razblaženja, tako da je dobijen raspon početnih koncentracija ekstrakta 10-200.0 mg/mL. Standardni COX-1 inhibitor (aspirin) korišćen je u rasponu koncentracija 0.01-0.6 mg/mL, a standardni 12-LOX inhibitor (kvercetin) u rasponu koncentracija 0.156-5.0 mg/mL.

Faze eksperimentalne procedure za određivanje inhibicije COX-1 i 12-LOX su prikazane u *Tabeli 3.16*.

Na osnovu odnosa površine pika metabolita (12-HHT ili 12-HETE) i površine pika internog standarda ( $\text{PGB}_2$ ) dobijene su vrednosti  $R_{\text{rp}}$  (radna proba),  $R_{\text{kor}}$  (korekcija),  $R_{\text{kon}}$  (kontrola) i  $R_{\text{sp}}$  (slepa proba) za odgovarajuće probe, a inhibicija enzima računata je sledećom jednačinom:

$$I (\%) = (1 - (R_{\text{rp}} - R_{\text{kor}}) / (R_{\text{kon}} - R_{\text{sp}})) \times 100\%$$

Na osnovu I vrednosti određene su  $\text{IC}_{50}$  vrednosti (koncentracija pri kojoj je aktivnost enzima inhibirana 50%) očitavanjem sa odgovarajućeg grafika (funkcija I (%) u zavisnosti od radne koncentracije), a rezultat je izražen kao srednja vrednost tri određene  $\text{IC}_{50}$  vrednosti  $\pm$  standardna devijacija (mg/mL).

Tabela 3.16. Eksperimentalni postupak za određivanje inhibicije COX-1 i 12-LOX

Radna proba	Korekcija	Kontrola	Slepa proba
$4 \times 10^8$ trombocita u 2.0 mL pufera pH 7.2	$4 \times 10^8$ trombocita u 2.0 mL pufera pH 7.2	$4 \times 10^8$ trombocita u 2.0 mL pufera pH 7.2	$4 \times 10^8$ trombocita u 2.0 mL pufera pH 7.2
<i>Inkubacija 5 min na 37°C uz blago mućkanje</i>			
0.1 mL ekstrakt	0.1 mL ekstrakt	0.1 mL DMSO	0.1 mL DMSO
0.1 mL 125 $\mu$ mol/L A23187	0.1 mL DMSO	0.1 mL 125 $\mu$ mol/L A23187	0.1 mL DMSO
<i>Inkubacija 2 min na 37°C uz blago mućkanje</i>			
0.3 mL 16.66 mmol/L CaCl <sub>2</sub>	0.3 mL dH <sub>2</sub> O	0.3 mL 16.66 mmol/L CaCl <sub>2</sub>	0.3 mL dH <sub>2</sub> O
<i>Inkubacija 5 min na 37°C uz blago mućkanje</i>			
5.8 mL 1% HCOOH (4°C)*	5.8 mL 1% HCOOH (4°C)*	5.8 mL 1% HCOOH (4°C)*	5.8 mL 1% HCOOH (4°C)*
50 $\mu$ L 6 $\mu$ g/mL PGB <sub>2</sub>	50 $\mu$ L 6 $\mu$ g/mL PGB <sub>2</sub>	50 $\mu$ L 6 $\mu$ g/mL PGB <sub>2</sub>	50 $\mu$ L 6 $\mu$ g/mL PGB <sub>2</sub>
8.0 mL smeše CHCl <sub>3</sub> :MeOH (1:1)	8.0 mL smeše CHCl <sub>3</sub> :MeOH (1:1)	8.0 mL smeše CHCl <sub>3</sub> :MeOH (1:1)	8.0 mL smeše CHCl <sub>3</sub> :MeOH (1:1)
<i>Ekstrakcija (intenzivno mućkanje, Vortex) 15 min</i>			
<i>Centrifugiranje 7012 <math>\times</math> g, 15 min na 4°C</i>			
<i>Odvajanje organskog sloja</i>			
<i>Uparavanje</i>			
<i>Rastvaranje suvog ostatka u 0.5 mL MeOH</i>			
<i>Ceđenje preko milipor filtera</i>			
<i>LC-MS/MS analiza</i>			

\*u slučaju da se formira gel, smeša se, pre dodatka 1% HCOOH, intenzivno mućka (Vortex) do tečnog stanja

### ***Optimizovani LC-MS/MS parametri:***

Za hromatografsko razdvajanje korišćena je Zorbax SB-C18 30 mm  $\times$  2.1 mm  $\times$  3.5  $\mu$ m (Agilent Technologies) reversno-fazna kolna pri temperaturi od 65°C. Binarna mobilna faza sastojala se od 0.6% sirćetne kiseline (A) i metanola (B), a protok je iznosio 1.0 mL/min. Primenjen je gradijentni mod, koji je podrazumevao sledeći odnos faza: 0.0 min 65% B, 2.0 min 100% B, 3.5 min 100% B, sa post-vremenom od 3.0 min. Injektovana zapremina svih uzoraka je bila 5  $\mu$ L. ESI parametri bili su: gas za sušenje (N<sub>2</sub>) temperature 350°C, protok 9 L/min, pritisak gasa nebulajzera 40 psi i napon na kapilari 4 kV, a ostali

optimizovani parametri prikazani su u *Tabeli 3.17*. Kvantifikacija jedinjenja urađena je u negativnom MRM modu.

*Tabela 3.17.* Optimizovani parametri za kvantifikaciju 12-HHT, 12-HETE i PGB<sub>2</sub>

Vremenski segment (min)	Jedinjenje	Mod	Polarnost jona	Jonska vrsta	Jon prekursor (m/z)	Jon proizvod (m/z)	Koliziona energija (V)	Napon fragmentora (V)
0.0-0.9	PGB <sub>2</sub>	MRM	-	(M-H) <sup>-</sup>	333	315	13	120
	12-HHT	MRM	-	(M-H) <sup>-</sup>	279	261	5	120
0.9-3.5	12-HETE	MRM	-	(M-H) <sup>-</sup>	319	310	7	120

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1. Fitohemijski skrining

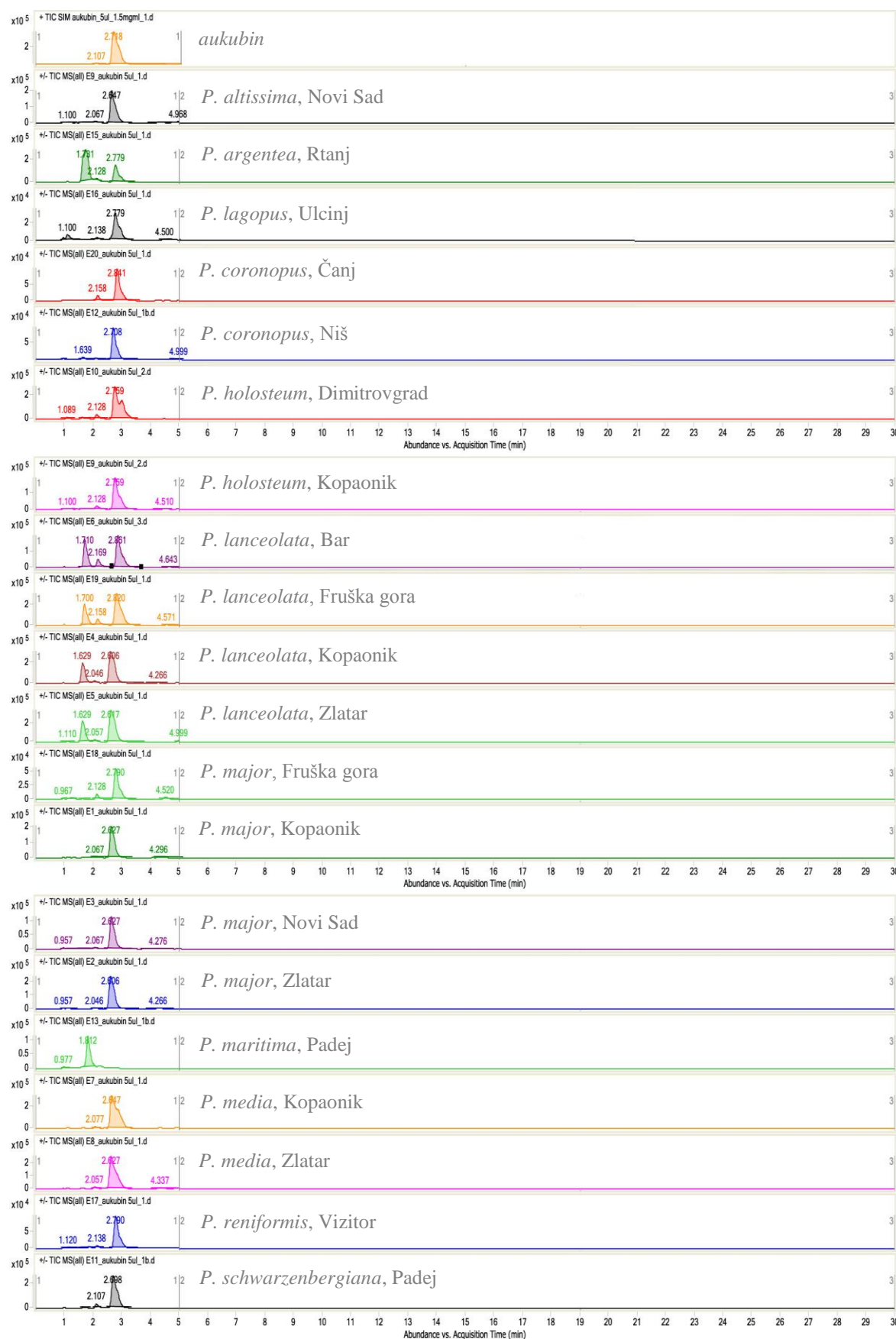
Fitohemijska ispitivanja metanolnih ekstrakata jedanaest vrsta roda *Plantago* prikazanih u ovom radu obuhvatala su dva glavna pravca: kvantifikaciju iridoida aukubina i šest flavonoida primenom LC-MS/MS tehnike, uz skrining sastava (HPLC-MS) u cilju utvrđivanja razlika između različitih ili istih vrsta sa različitih lokaliteta.

U cilju utvrđivanja razlika u kvalitativnom sastavu ispitivanih ekstrakata, urađen je skrining primenom HPLC-MS metode (scan mod), a na *Slikama 8.1.-8.11. (Poglavlje 8.1.1.)* prikazani su dobijeni hromatogrami ispitanih ekstrakata. Analizom hromatograma mogu se uočiti značajne *kvalitativne* razlike u sastavu ispitanih ekstrakata različitih vrsta, dok su kod ekstrakata iste vrste sa različitih lokaliteta dominantne razlike u *kvantitativnom* sadržaju. Međutim, osnovni cilj fitohemijskih ispitivanja je zapravo bilo kvantitativno određivanje sadržaja iridoida aukubina i flavonoida apigenin-7-*O*-glukozida, luteolin-7-*O*-glukozida, rutina, kao i odgovarajućih aglikona apigenina, luteolina i kvercetina primenom visoko selektivne i specifične LC-MS/MS tehnike, koja omogućava detekciju vrlo niskih koncentracija ispitivanog analita.

Iridoidi su klasa jedinjenja čije prisustvo je karakteristično za vrste roda *Plantago* i predstavljaju njihove značajne hemotaksonomske markere (Andrzejewska-Golec i sar., 1993; Andrzejewska-Golec, 1997; Handjieva i Saadi, 1991; Long i sar., 1995; Taskova i sar., 1999; Rønsted i sar., 2000; Taskova i sar., 2002; Gálvez i sar., 2005a; Gálvez i sar., 2005b), u okviru opsežnijih ispitivanja, urađena je kvantitativna determinacija aukubina u sedam vrsta roda *Plantago* primenom HPLC, HPTLC i LC-MS/MS metoda (Janković i sar., 2010). Pored optimizacije HPTLC (*high performance thin layer chromatography*, visoko efikasna hromatografija na tankom sloju) i validacije HPLC metode, razvijena je i odgovarajuća LC-MS/MS metoda za kvantifikaciju aukubina. Statističkom obradom dobijenih rezultata (studentov *t*-test, nivo značajnosti 5%), utvrđeno je da nema značajnih razlika između rezultata dobijenih primenom validovane HPLC i HPTLC metode, dok su izvesna odstupanja u odnosu na LC-MS/MS metodu primećena pri analizi dva ekstrakta. Shodno tome, ove tri metode predstavljaju pouzdan način za kvantifikaciju aukubina u vrstama roda *Plantago*.

Hromatogrami ispitivanih uzoraka u kojima je određen sadržaj aukubina primenom LC-MS/MS tehnike prikazani su na *Slici 4.1.*

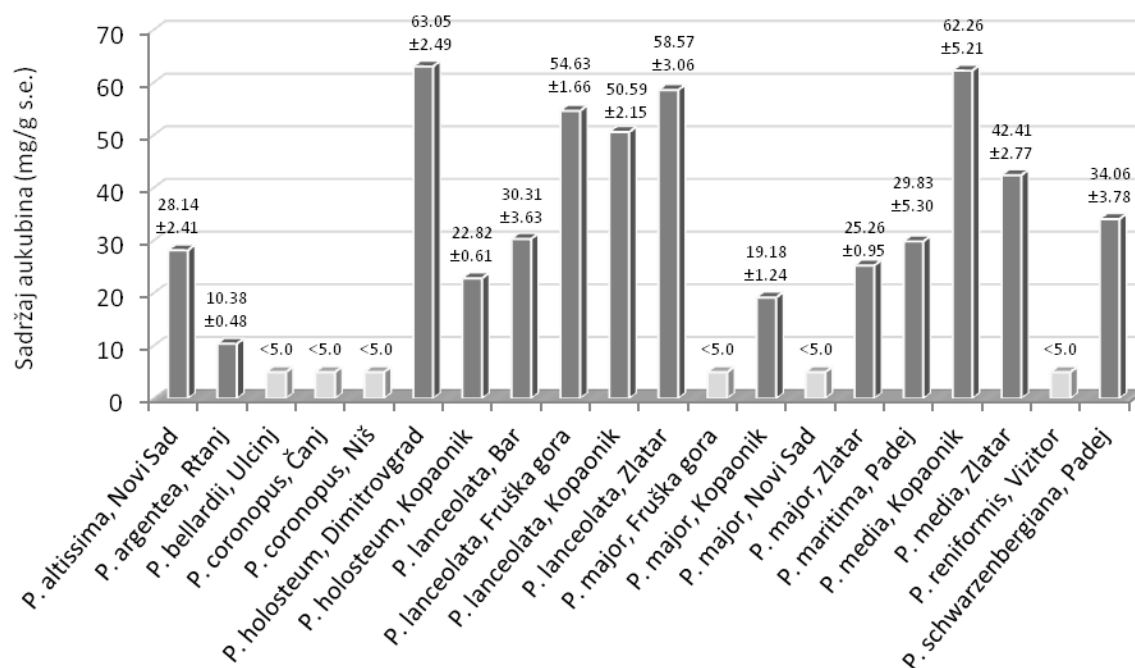




Slika 4.1. Kvantifikacija aukubina: hromatogrami aukubina i ispitivanih ekstrakata dobijeni LC-MS/MS analizom

Odgovarajuća kalibraciona kriva (funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije aukubina) na osnovu koje je kvantifikovan aukubin, kao i tabelarni prikaz dobijenih rezultata dati su u *Prilogu (Poglavlje 8.1.2., Grafik 8.1., Tabele 8.1. i 8.2.)*.

Na *Histogramu 4.1.* prikazan je sadržaj aukubina u ispitivanim uzorcima.



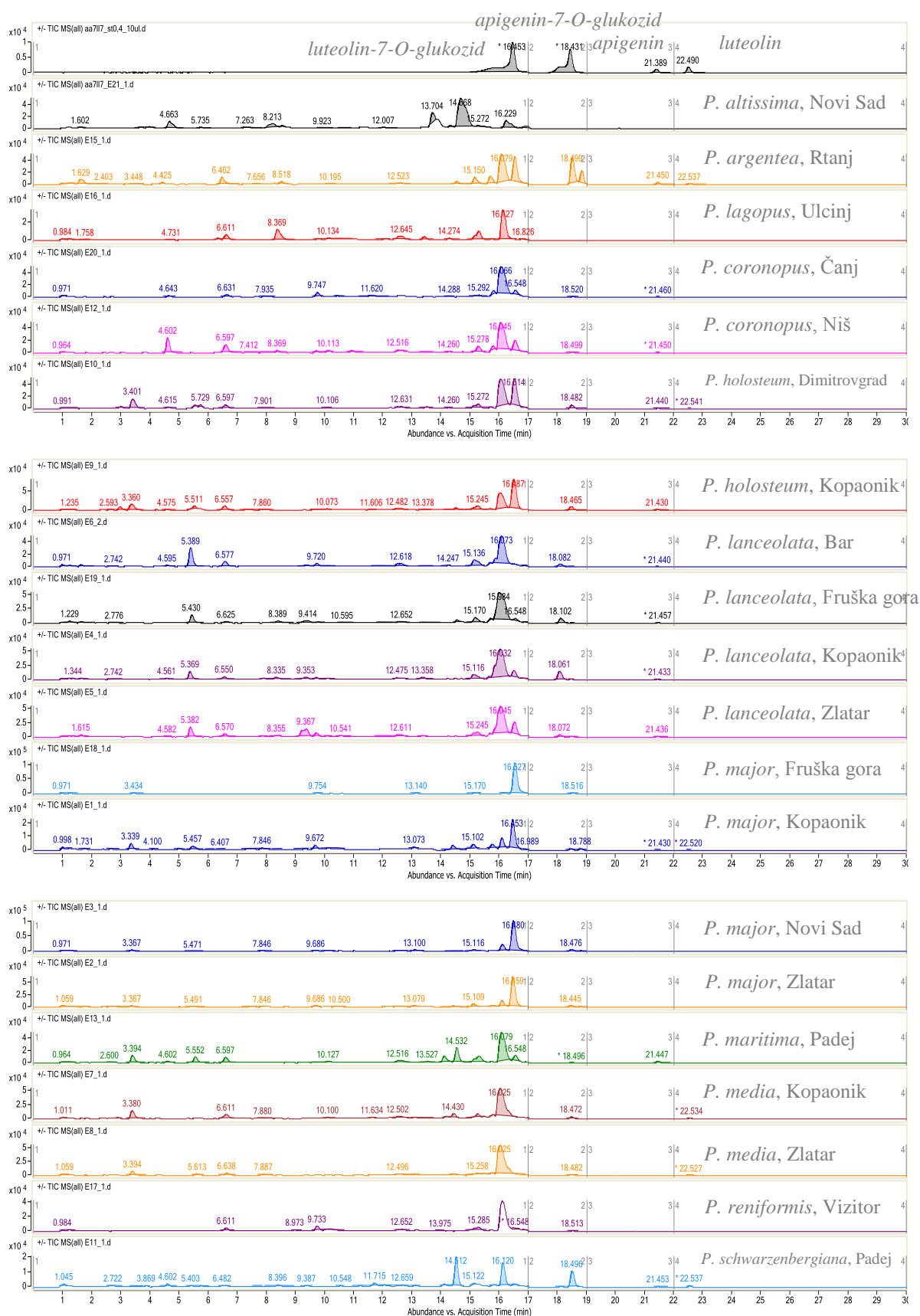
*Histogram 4.1.* Sadržaj aukubina u ekstraktima bokvica

Dobijeni rezultati potvrđuju prisustvo aukubina u svim ispitanim vrstama, uzimajući u obzir da je kod vrsta *P. bellardii* (Ulcinj), *P. coronopus* (oba lokaliteta), *P. major* (Fruška gora i Novi Sad) i *P. reniformis* (Visitor) utvrđena količina bila manja od 5.0 mg aukubina/g s.e., odnosno da je detektovana koncentracija bila niža od koncentracionog opsega korišćenog za kalibracionu krivu. Sadržaj aukubina u ostalim ekstraktima iznosio je od 19.18 (*P. major*, Kopaonik) do 63.05 mg/g s.e. (*P. holosteuum*, Dimitrovgrad). Značajne kvantitativne razlike zapažaju se kod većine ekstrakata iste vrste sa različitih lokaliteta (*P. holosteuum*, Kopaonik i Dimitrovgrad 22.82 i 63.05 mg aukubina/g s.e.; *P. lanceolata*, Bar 30.31 i *P. lanceolata* Fruška gora, Kopaonik, Zlatar 50.59-58.57 mg /g s.e.; *P. media*, Zlatar i Kopaonik 42.41 i 62.26 mg /g s.e.), dok su kod ekstrakata *P. major*, Fruška gora i *P. major*, Novi Sad detektovane količine bile u tragovima (manje od 5.0 mg/g s.e.), a sa lokaliteta Kopaonik i Zlatar 19.18 i 25.26 mg aukubina/g s.e. U kvalitativnom smislu, dobijeni rezultati za vrste *P. altissima*, *P.*

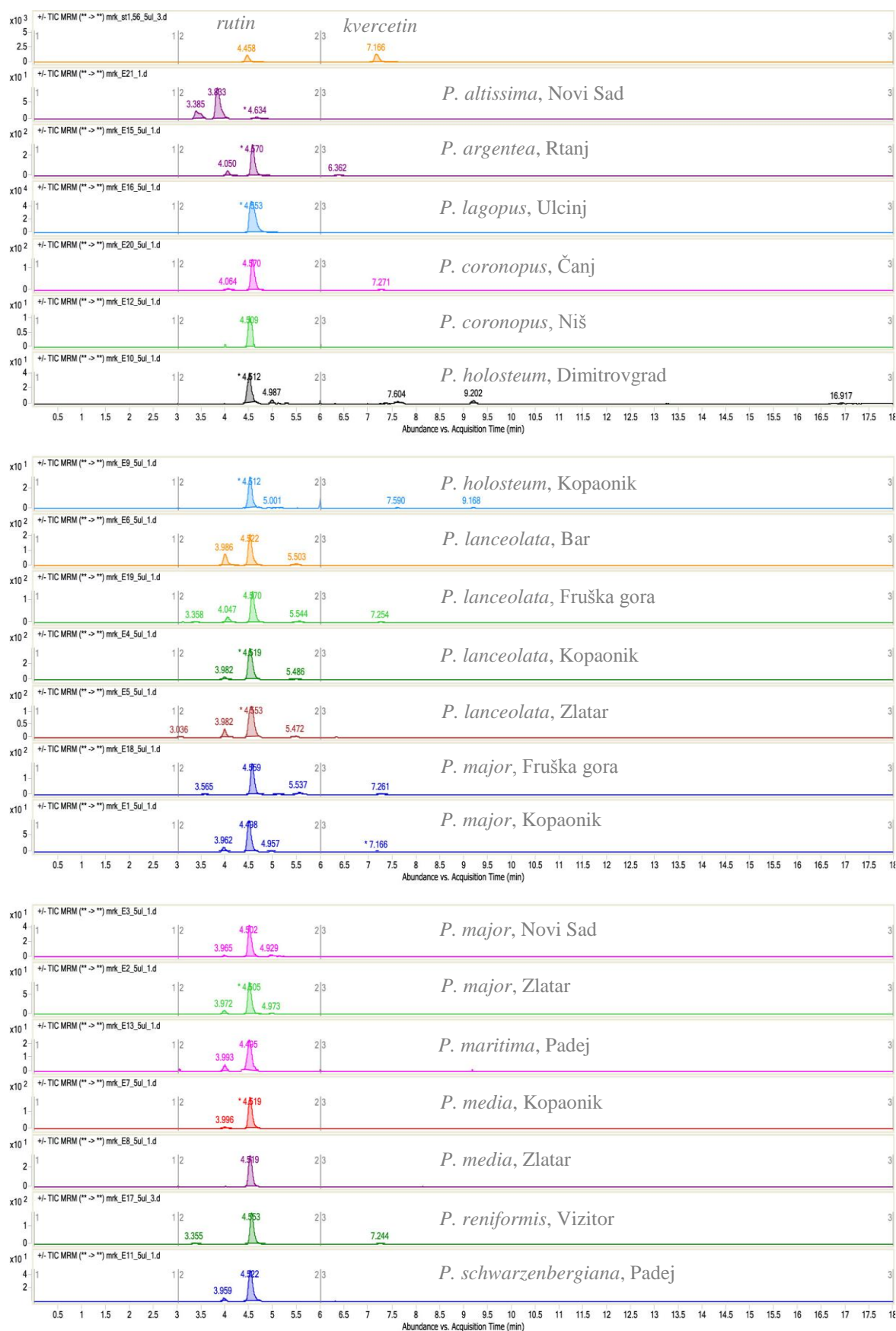
*argentea*, *P. bellardii*, *P. coronopus*, *P. lanceolata*, *P. major*, *P. maritima*, *P. media* i *P. reniformis* su u skladu sa literaturnim podacima (Taskova i sar., 1999; Rønsted i sar., 2000; Taskova i sar., 2002; Rønsted i sar., 2003; Jurišić-Grubešić i Vladimir-Knežević, 2004). Takođe, prisustvo aukubina u vrstama *P. schwarzenbergiana* i *P. holosteum*, koja su prvi put objavili Janković i saradnici (2010), potvrđeno je i u ispitanim ekstraktima sa lokaliteta Padej (*P. schwarzenbergiana*) i Kopaonik i Dimitrovgrad (*P. holosteum*). Međutim, Jurišić-Grubešić i Vladimir-Knežević (2004) nisu detektovali aukubin u ekstraktima vrsta *P. coronopus* i *P. holosteum*. Ova razlika može se objasniti primenom različitih metoda za detekciju. Naime, Jurišić-Grubešić i Vladimir-Knežević (2004) primenili su tankoslojnu hromatografiju u cilju identifikacije iridoidnih jedinjenja, odnosno aukubina, dok je u našim analizama korišćena LC-MS/MS tehnika, koja omogućava visoko selektivnu i specifičnu detekciju vrlo malih količina odabranog jedinjenja.

Glavni cilj fitohemijskih ispitivanja odabranih vrsta bokvica bila je kvantifikacija određenih flavonoida: apigenin-7-*O*-glukozida, luteolin-7-*O*-glukozida, rutina, kao i odgovarajućih aglikona apigenina, luteolina i kvercetina primenom LC-MS/MS tehnike. Jedan od glavnih razloga zbog čega je odabrana karakterizacija ove klase polifenolnih jedinjenja je što flavonoidi, pored toga što imaju važnu ulogu u fiziologiji biljaka, poseduju i izuzetno široki spektar drugih bioloških dejstva. Naime, poznato je da su flavonoidi snažni antioksidansi, zatim da mogu biti imuni modulatori, neurostimulatori, analgetici, antiinflamatorni, antialergijski, antiasmatski, antiviralni, antibakterijski, antifungalni i antikancerogeni agensi. Takođe, flavonoidi se koriste kako u prevenciji, tako i u lečenju bolesti kardiovaskularnog sistema, gastrointestinalnog trakta, hiperholesterolemije i arteroskleroze, dijabetesa, za zaceljivanje rana i regeneraciju tkiva, pa čak i u lečenju steriliteta (Slezak i sar, 1995; Giugliano i sar., 1996; Havsteen, 2002; Harrison i sar., 2003; Halliwell, 2007). Uopšteno, poznajući kvalitativni i kvantitativni sastav flavonoidnih komponenti, moguće je pretpostaviti koji tip biološke aktivnosti bi mogao ispoljavati određeni biljni ekstrakt, što može biti smernica za dalje *in vitro* i *in vivo* testove. Naravno, konačni potencijal biljnih ekstrakata može biti utvrđen samo u *in vivo* testovima, a zavisi od velikog broja faktora, kao što su prisustvo drugih biološki aktivnih jedinjenja, sinergističko dejstvo komponenata, citotoksičnost i dr.

Optimizovani parametri LC-MS/MS analize prikazani su u *Poglavlju 3.2.3.*, a dobijeni hromatogrami smeše standarda i ispitivanih ekstrakata prikazani su na *Slikama 4.2. i 4.3.*



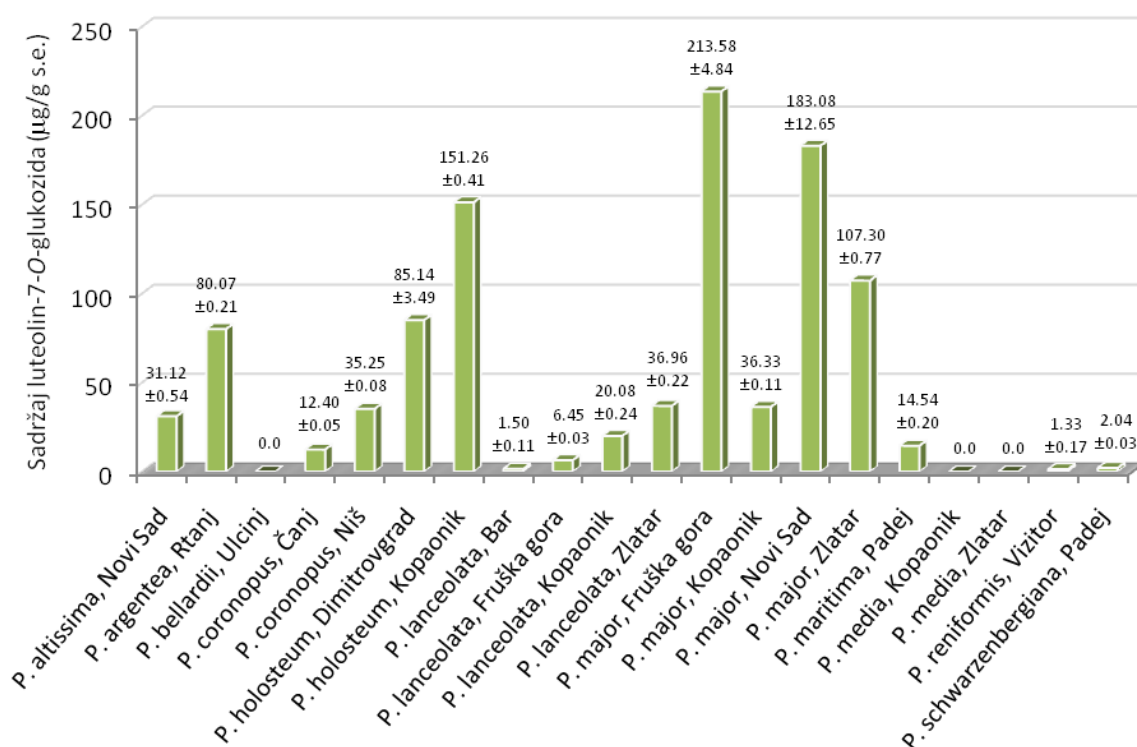
Slika 4.2. Kvantifikacija apigenina, apigenin-7-O-glukozida, luteolina i luteolin-7-O-glukozida: hromatogrami smeše standarda i ispitivanih ekstrakata dobijeni LC-MS/MS analizom



Slika 4.3. Kvantifikacija kvercetina i rutina: hromatogrami smeše standarda i ispitivanih ekstrakata dobijeni LC-MS/MS analizom

Sadržaj odabranih flavonoida određen je u dve odvojene analize, jer optimalni uslovi za kvantifikaciju navedenih jedinjenja podrazumevaju različite MS akvizicione modove i polarnost. U prvoj analizi, simultano je determinisan sadržaj apigenina, apigenin-7-*O*-glukozida, luteolina i luteolin-7-*O*-glukozida, a u drugoj kvercetina i rutina. Iako bi sadržaj ovih jedinjenja mogao da se odredi i drugim tehnikama, kao što je na primer HPLC sa UV detektorom, LC-MS/MS tehnika uz primenu MRM (*multiple reaction monitoring*) ili MS2SIM (*selected ion monitoring, single-stage MS*) moda je odabrana jer pruža izuzetne mogućnosti za praćenje samo jona odabranog analita, čime se postiže visoka selektivnost, specifičnost i mogućnost kvantifikacije malih količina ciljanog jedinjenja.

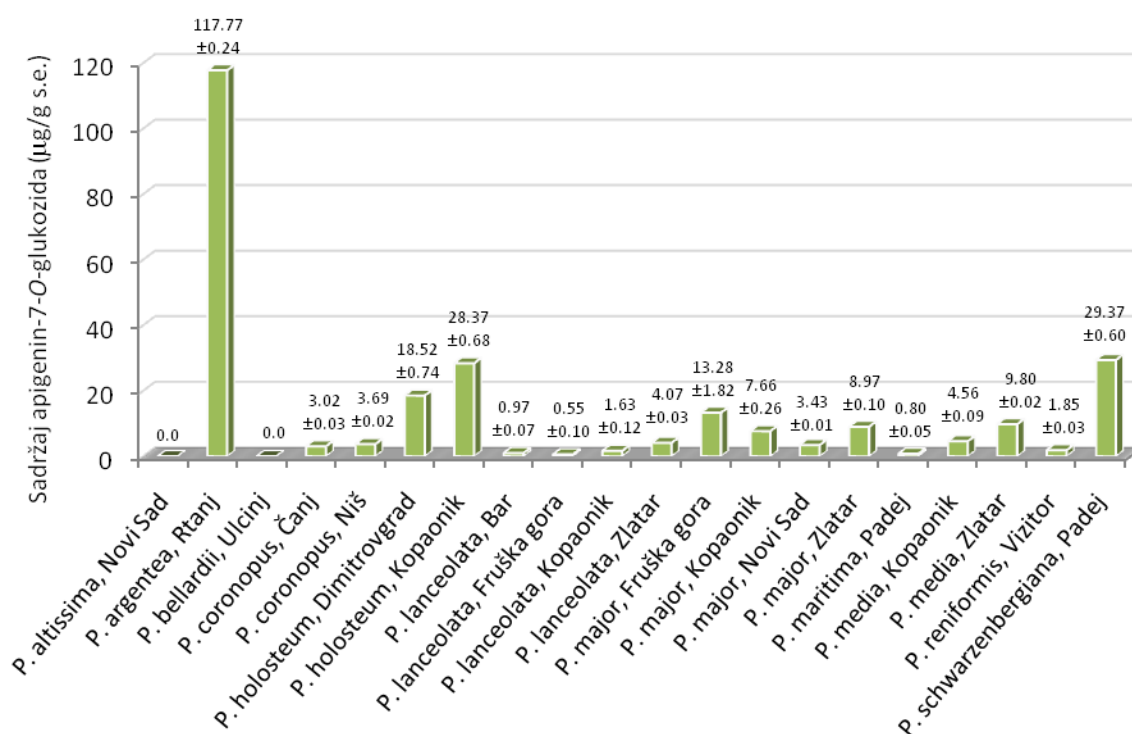
Odgovarajuće kalibracione krive na osnovu kojih je kvantifikovan sadržaj apigenina, apigenin-7-*O*-glukozida, luteolina, luteolin-7-*O*-glukozida, kvercetina i rutina, kao i tabelarni prikaz dobijenih rezultata dati su u *Poglavlju 8.1.3. (Grafici 8.2.-8.7. i Tabele 8.3.-8.14.)*, odnosno na *Histogramima 4.2.-4.7.*



Histogram 4.2. Sadržaj luteolin-7-*O*-glukozida u ekstraktima bokvica

Luteolin-7-*O*-glukozid, čiji sadržaj je iznosio od 1.33 (*P. reniformis*, Vizitor) do 213.58 µg/g s.e. (*P. major*, Fruška gora), detektovan je u svim ispitanim ekstraktima,

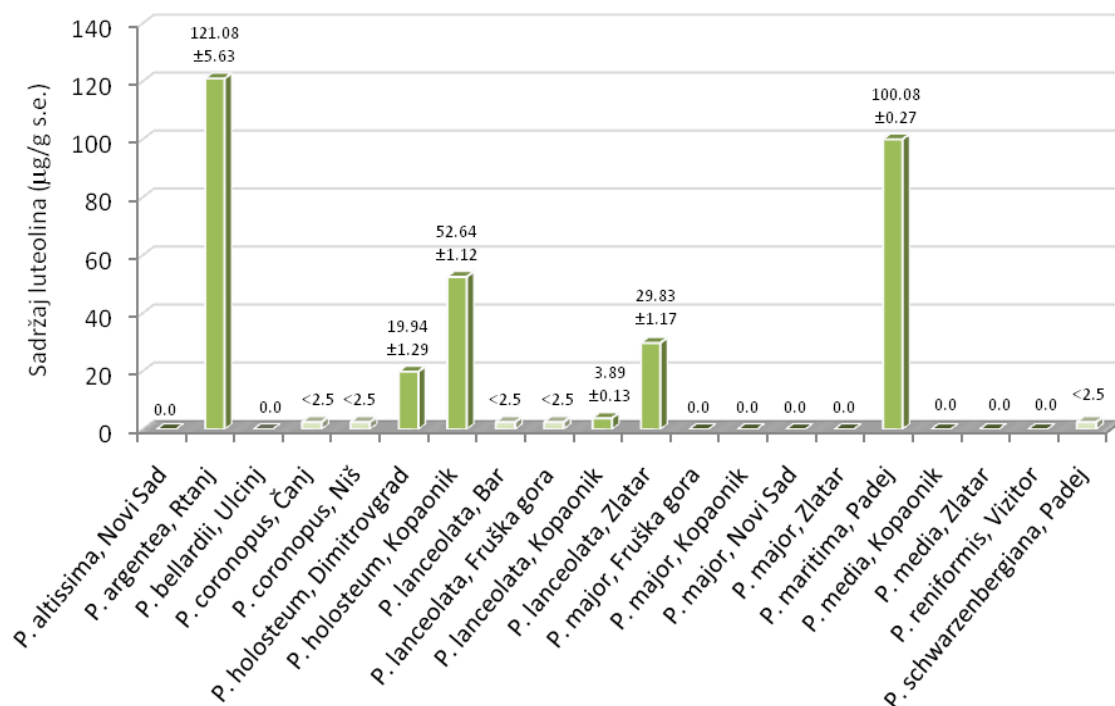
izuzev u ekstraktima vrsta *P. bellardii* i *P. media* (Histogram 4.2.). U kvalitativnom smislu, kod ekstrakata iste vrste sa različitih lokaliteta se ne uočavaju razlike, nasuprot kvantitativnom sadržaju koji je znatno varirao. U većini ispitanih vrsta luteolin-7-*O*-glukozid je prvi put determinisan, dok su dobijeni rezultati za vrste *P. lanceolata* i *P. major* u skladu sa literaturnim podacima (Kawashty i sar., 1994).



Histogram 4.3. Sadržaj apigenin-7-*O*-glukozida u ekstraktima bokvica

U svim ispitanim ekstraktima, osim u ekstraktima vrsta *P. altissima* i *P. bellardii* potvrđeno je prisustvo apigenin-7-*O*-glukozida, čiji sadržaj je iznosio od 0.80 u *P. maritima*, Padej do 117.77 µg/g s.e. u *P. argentea*, Rtanj (Histogram 4.3.). Iako postoje manje razlike u kvantitativnom, kvalitativni sadržaj ovog jedinjenja se ne razlikuje u ekstraktima istih vrsta sa različitog lokaliteta. Takođe, u većini ispitanih vrsta sadržaj apigenin-7-*O*-glukozida je prvi put determinisan, dok su dobijeni rezultati za vrste *P. lanceolata* i *P. major* u skladu sa literaturnim podacima (Kawashty i sar., 1994).



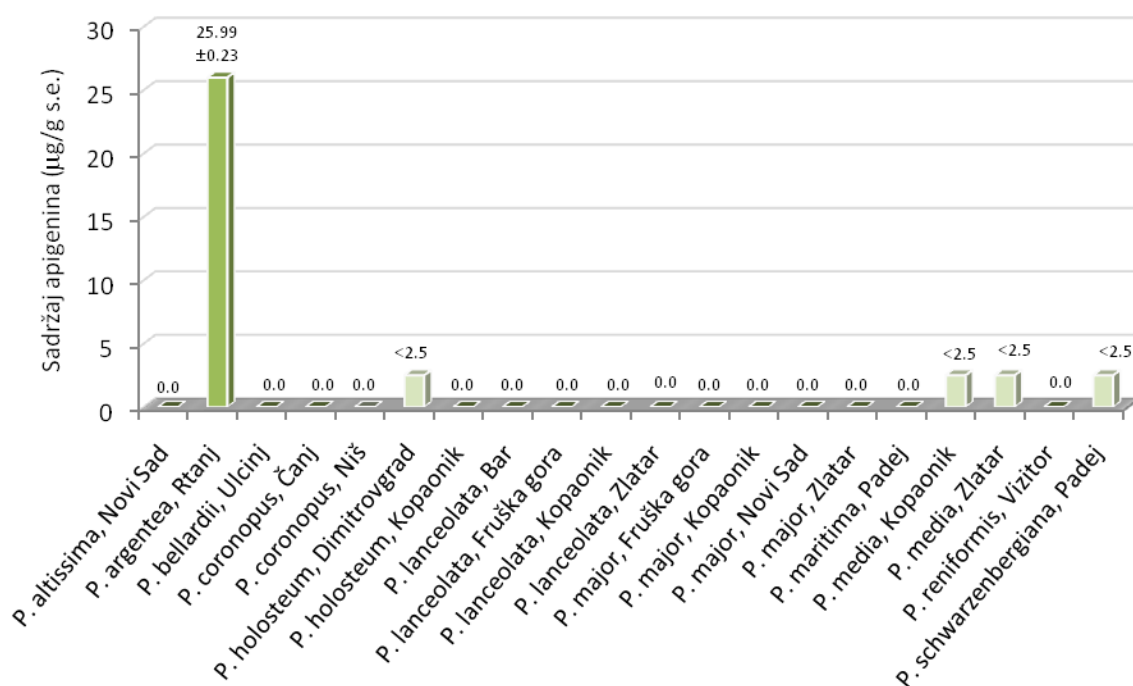


Histogram 4.4. Sadržaj luteolina u ekstraktima bokvica

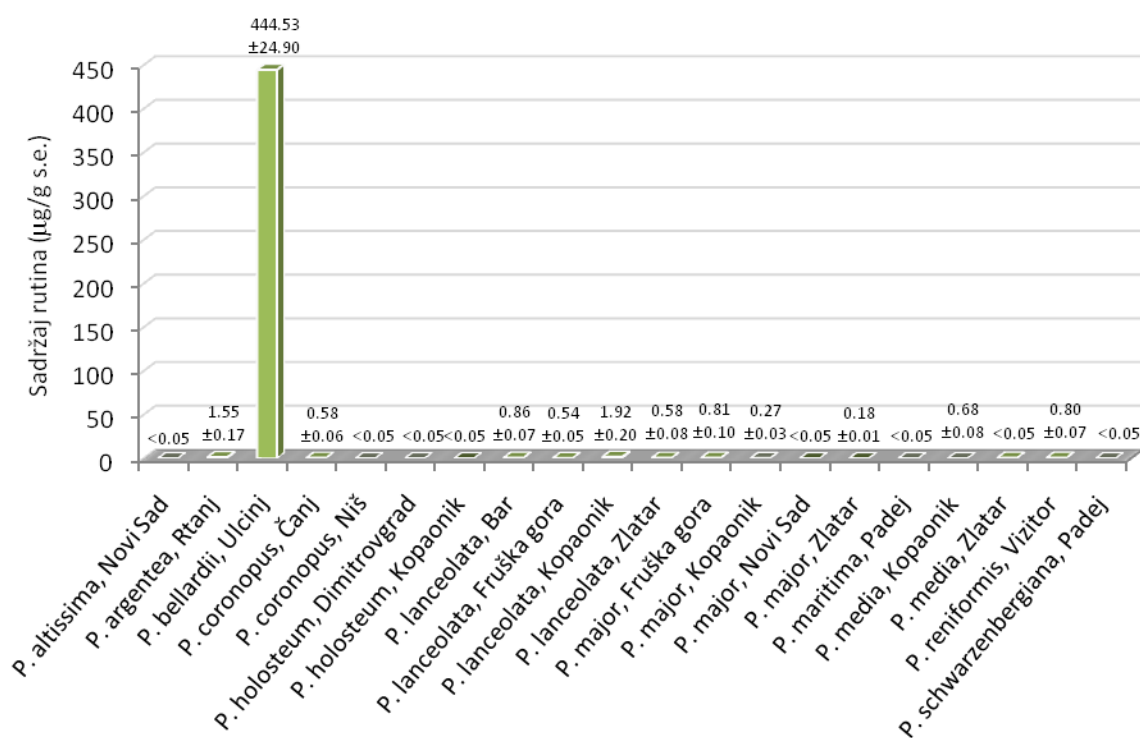
Prisustvo luteolina (Histogram 4.4.) potvrđeno je u vrstama *P. argentea*, *P. holosteam* i *P. maritima* (od 19.94 za *P. holosteam*, Dimitrovgrad do 121.08 µg/g s.e. za *P. argentea*, Rtanj). Takođe, ovo jedinjenje je kvantifikovano i u vrstama *P. coronopus*, *P. lanceolata* (lokaliteti Fruška gora i Bar) i *P. schwarzenbergiana*, ali u znatno nižim količinama (manje od 2.5 µg/g s.e.). Značajna kvantitativna razlika uočava se kod ekstrakata *P. lanceolata* sa različitih lokaliteta. Naime, u količinama manjim od 2.5 µg/g s.e. luteolin je određen u ekstraktima sa lokaliteta Fruška gora i Bar, neznatno više sa lokaliteta Kopaonik (3.89 µg/g s.e.), dok je u ekstraktu sa lokaliteta Zlatar određeno 29.83 µg luteolina/g s.e. Dobijeni rezultati za *P. lanceolata* i *P. major* su u skladu sa literaturnim podacima (Kawashty i sar., 1994).

Značajnu količinu apigenina (Histogram 4.5.) sadrži samo vrsta *P. argentea* (25.99 µg/g s.e.), dok u ekstraktima *P. holosteam*, Dimitrovgrad i *P. media* i *P. schwarzenbergiana* ovog jedinjenja ima manje od 2.5 µg/g s.e. Kawashty i saradnici (1994) utvrdili su takođe da se apigenin ne nalazi u vrsti *P. major*, odnosno da je prisutan u manjim količinama u *P. lanceolata*.





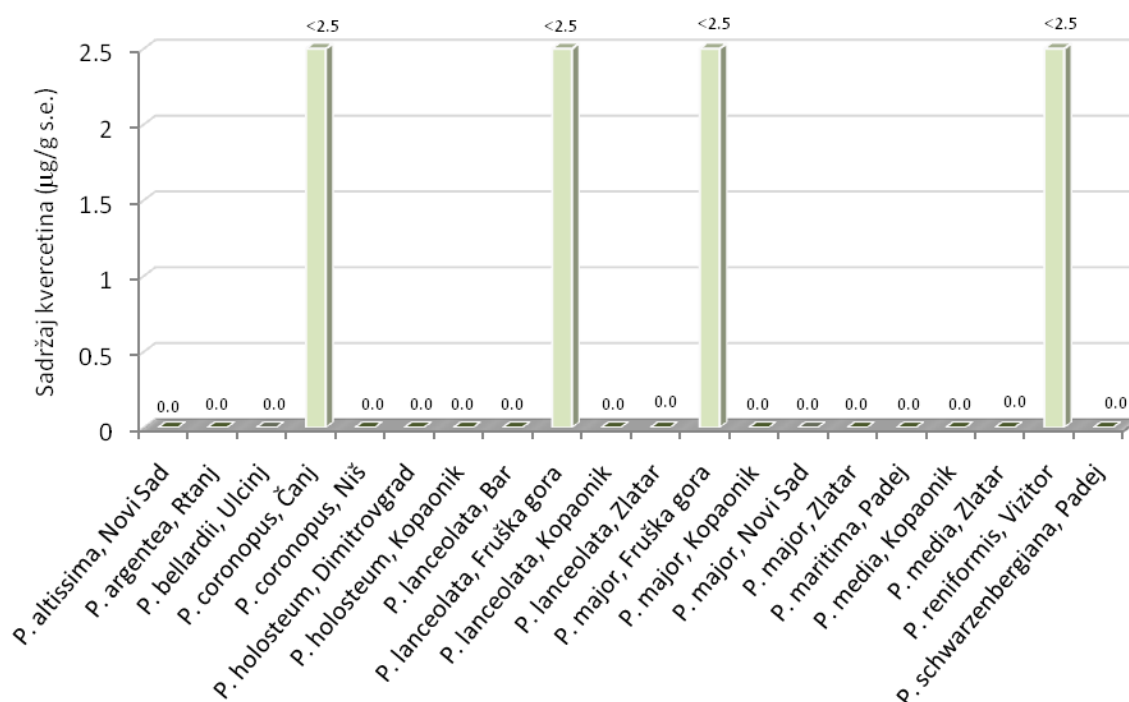
Histogram 4.5. Sadržaj apigenina u ekstraktima bokvica



Histogram 4.6. Sadržaj rutina u ekstraktima bokvica

Izuzetno visok sadržaj rutina (Histogram 4.6.) utvrđen je u ekstraktu *P. bellardii* (444.532.5 µg/g s.e.), koji je ujedno bio i jedini detektovani flavonoid u ovoj vrsti, što je u

skladu sa literaturnim navodom (Gálvez i sar., 2005b). Znatno manje količine određene su u ostalim ekstraktima (od 0.27  $\mu\text{g/g}$  s.e. u *P. major*, Kopaonik do 1.92  $\mu\text{g/g}$  s.e. u *P. lanceolata*, Kopaonik), dok je kod osam ekstrakata (*P. altissima*, Novi Sad; *P. coronopus*, Niš; *P. holostium*, Dimitrovgrad i Kopaonik; *P. major*, Novi Sad; *P. maritima*, Padej; *P. media*, Zlatar; *P. schwarzenbergiana*, Padej) sadržaj rutina bio ispod 0.05  $\mu\text{g/g}$  s.e. Jurišić-Grubešić i Vladimir-Knežević (2004) su, ispitujući fitohemijski sastav šest vrsta roda *Plantago* (*P. altissima*, *P. argentea*, *P. coronopus*, *P. holostium*, *P. lagopus* i *P. maritima*) utvrdili prisustvo rutina samo u *P. lagopus*. Uzrok neslaganja rezultata dobijenih za ostale vrste je najverovatnije primena različitih metoda za detekciju niskog sadržaja odabranog jedinjenja (rutina), pri čemu su navedeni autori koristili tankoslojnu hromatografiju, koja ne može biti validna metoda, posebno u slučajevima kada se određuju male količine jedinjenja, dok je u našim analizama primenjena LC-MS/MS tehnika, koja omogućava visoko selektivnu i specifičnu detekciju.



Histogram 4.7. Sadržaj kvercetina u ekstraktima bokvica

Iako je kvercetin izuzetno zastupljen u biljnim vrstama, rezultati ispitivanja odabranih bokvica (Histogram 4.7.) ukazuju na vrlo nizak sadržaj (manje od 2.5  $\mu\text{g/g}$  s.e) ovog flavonoida samo u pojedinim ekstraktima vrsta *P. coronopus*, *P. lanceolata*, *P. major* i *P. reniformis*. Uzrok uočljive razlike u sadržaju kvercetina u svim ekstraktima

iste vrste sa različitih lokaliteta, je najverovatnije, pored izvesnih razlika u samom sastavu ekstrakata, vrlo niska koncentracija ovog jedinjenja i nemogućnost njegove kvantifikacije.

U kvantitativnom smislu, sadržaj flavonoida koji je određen u ispitanim ekstraktima može ukazati na potencijalnu biološku aktivnost date vrste, uzimajući u obzir primenjenu koncentraciju aktivne komponente u biohemijским testovima. Na primer, utvrđeno je inhibitorno dejstvo luteolin-7-*O*-glukozida na rast MCF-7 ćelija (ćelije adenokarcinoma dojki), pri čemu je vrednost GI<sub>50</sub> (koncentracija potrebna da se inhibira rast ćelije za 50%) postignuta pri koncentraciji od 40 µg/mL, dok je luteolin značajno inhibirao rast UACC-62 ćelija (ćelije melanoma), postižući GI<sub>50</sub> pri 10 µg/mL (Gálvez i sar., 2003). Ekstrakti, u kojima je utvrđeno prisustvo luteolin-7-*O*-glukozida i luteolina, sadrže ova jedinjenja u količinama koje su dovoljne da se postigne inhibicija rasta navedenih ćelijskih linija, pa se može pretpostaviti da ispitane vrste poseduju antikancerogenu aktivost. Slično tome, upotreba ovi ekstrakata kao antispazmatskih agenasa može biti implicirana sadržajem luteolina, koji je, po literaturnim navodima (Fleer i Verspohl, 2007), dovoljan za ispoljavanje ovog efekta.

U kvalitativnom smislu, dobijeni rezultati za vrste čiji flavonoidni sastav do sada nije bio ispitan (*P. altissima*, *P. argentea*, *P. coronopus*, *P. holosteum*, *P. maritima*, *P. media*, *P. reniformis* i *P. schwarzenbergiana*), kao i rezultati koji su u saglasnosti sa ranijim ispitivanjima *P. bellardii*, *P. major*, *P. lanceolata* (Kawashty i sar., 1994; Jurišić-Grubešić i Vladimir-Knežević, 2004; Gálvez i sar., 2005b), ukazuju na to da ove vrste mogu biti svrstane u flavonski (flavon glikozidni) hemotip, jer su luteolin-7-*O*-glukozid, apigenin-7-*O*-glukozid i odgovarajući aglikoni dominantno zastupljeni, dok su flavonoli kvercetin i rutin detektovani samo u pojedinim vrstama i u vrlo malim količinama.

## 4.2. Antioksidantna aktivnost

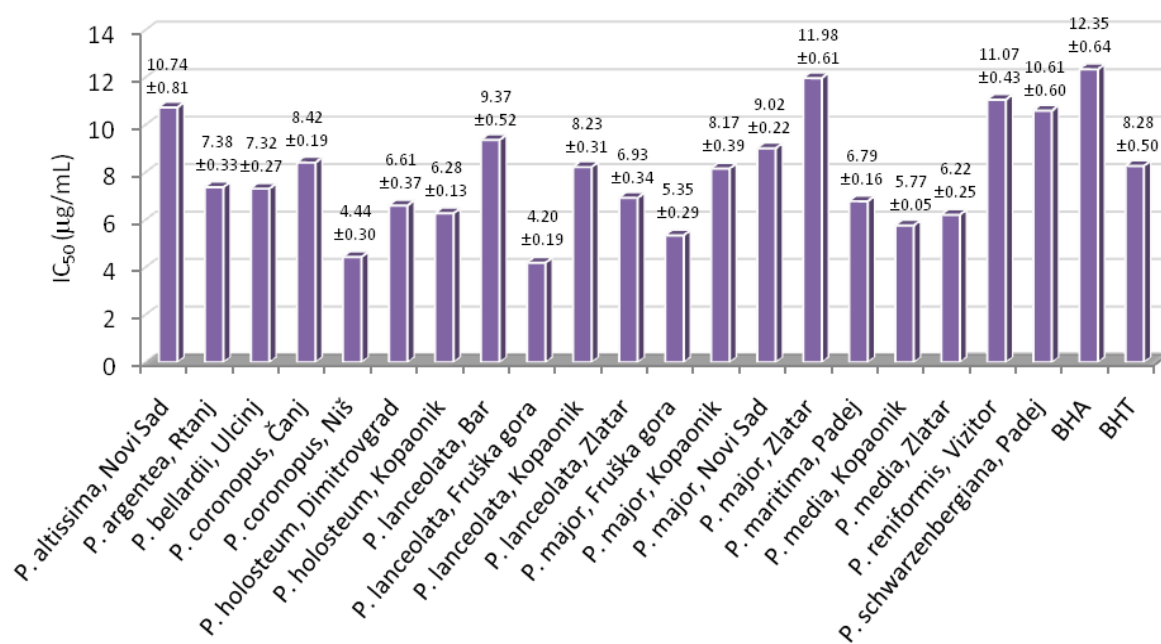
Kao što je navedeno u Poglavlju 2.2., reaktivne vrste kiseonika i azota su endogeni intermedijeri koji neprekidno nastaju u živim ćelijama i imaju esencijalnu ulogu u regulaciji niza fizioloških procesa, tako što učestvuju u signalizaciji ćelijskih funkcija (proliferacija, inflamacija i adhezija), fagocitozi, regulaciji ćelijskog rasta, sintezi biološki važnih jedinjenja i sl. Međutim, niz faktora, kao što su iradijacija, zagađenje vazduha, pušenje, i sl. utiču na povećanje nivoa slobodnoradikalnih vrsta, koje zatim mogu da reaguju sa neradikalnim vrstama i naruše normalnu homeostazu ćelije. Naime, slobodni

radikali mogu da se adiraju na drugi molekul i izazovu njegovo oštećenje (npr. adicija  $\text{HO}^\bullet$  na DNK), mogu da abstrahuju proton (npr. iz ugljovodoničnog niza membranske nezasićene masne kiseline, izazivajući lipidnu peroksidaciju), mogu da budu redukujući (doniranje jednog elektrona) ili oksidativni (abstrakcija jednog elektrona) agensi, pri čemu nastaju nove radikalske vrste i zapravo započinje lančana reakcija. Antioksidativni sistem ćelije ima glavnu ulogu u zaštiti od slobodnih radikala, odnosno u održavanju oksido-reduktivne ravnoteže u ćeliji. Ovaj sistem, koji sprečavanja stanja oksidativnog stresa i štiti od oksidativnog oštećenja, čine različiti endogeni proteini (vezuju metalne jone i na taj način sprečavaju katalizu na primer Fentonove reakcije), neproteinski biomolekuli (npr. askorbat, tokoferol) i enzimi (superoksid dizmutaza, glutation peroksidaza, peroksiredoksini i sl.) koji mogu da katalizuju prevođenje radikalskih u neradikalske vrste (Halliwell, 2006). Budući da je nivo slobodnih radikala u direktnoj vezi sa procesima oksidacije kako u hrani, tako i u biološkim sistemima, ispitivanje antioksidantnog potencijala biljnih ekstrakata, izolovanih prirodnih proizvoda ili sintetičkih jedinjenja je od izuzetnog značaja. Naime, u pogledu ispitivanja hrane, neophodno je odrediti efikasnost prirodnih antioksidanata pri zaštiti od oksidativnog oštećenja hrane, kao i antioksidantni kapacitet različitih biljaka, sa ciljem da se ishrana obogati vrstama koje su potentni „hvatači“ slobodnih radikala. Određivanjem antioksidantnog statusa u biološkim sistemima može se pratiti uticaj ishrane na oksidativni stres i doprinos u prevenciji bolesti čiji uzročnici su oksidativna oštećenja (Sánchez-Moreno, 2002). U skladu sa navedenim, ispitan je antioksidantni potencijal metanolnih ekstrakata vrsta roda *Plantago*, u cilju određivanja njihove sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala, uticaja na procese transfera elektrona i inhibiciju lipidne peroksidacije primenom više standardnih spektrofotometrijskih metoda. Budući da su fenolna jedinjenja, odnosno flavonoidi grupa prirodnih proizvoda koji su izuzetno potentni antioksidantni agensi, determinisan je njihov ukupni sadržaj u ispitanim ekstraktima, a zatim je urađena odgovarajuća regresiona analiza u cilju ispitivanja korelacije sadržaja ovih jedinjenja i antioksidantne aktivnosti.

Antioksidantna aktivnost ispitanih ekstrakata određena je primenom testova koji su zasnovani na transferu elektrona (neutralizacija  $\text{DPPH}^\bullet$  radikala i određivanje redukcione sposobnosti - FRAP test), neutralizaciji slobodnoradikalskih vrsta (kapacitet „hvatanja“  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  i NO radikala) i potencijalu inhibicije lipidne peroksidacije (Poglavlje 2.2.2.). Takođe, uporedno su ispitane i odgovarajuće aktivnosti potentnih, sintetičkih antioksidanasa BHA (butilovani hidroksianizol) i BHT (butilovani hidroksitoluen), koji se vrlo često koriste kao aditivi (E320 i E321), kako u hrani, tako i u farmaceutskim,

kozmetičkim i raznim industrijskim proizvodima. Tabele sa rezultatima spektrofotometrijskih merenja i grafici sa kojih su očitane  $IC_{50}$  vrednosti prikazani su u *Poglavlju 8.2. (Tabele 8.15.-8.58. i Grafici 8.8.-8.47.)*.

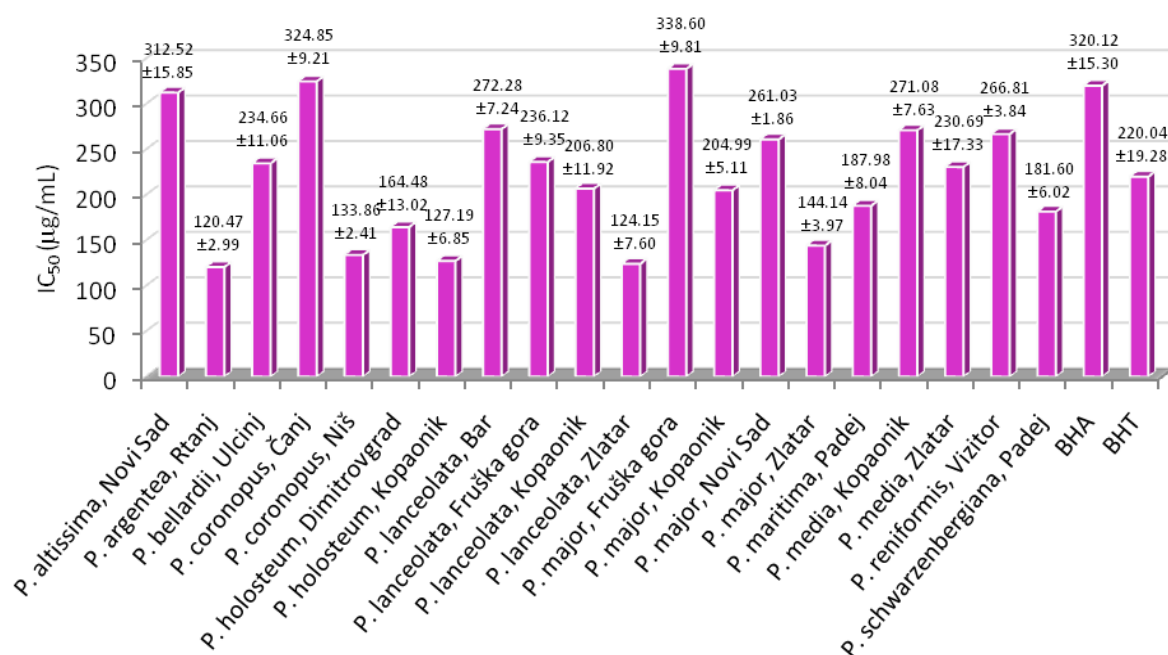
Određivanje kapaciteta neutralizacije  $DPPH^{\bullet}$  radikala je metoda koja zbog svoje tačnosti, brzine i komercijalne dostupnosti  $DPPH^{\bullet}$  reagensa ima široku primenu u ispitivanjima antioksidantnog potencijala biljnih ekstrakata (*Poglavlje 2.2.2.*). Na *Histogramu 4.8.* prikazane su  $IC_{50}$  vrednosti ( $\mu g/mL$ ) delovanja ekstrakta na neutralizaciju  $DPPH^{\bullet}$ .



*Histogram 4.8. Potencijal neutralizacije  $DPPH^{\bullet}$  radikala*

$IC_{50}$  vrednost ispitanih ekstrakata iznose od 4.20 (*P. lanceolata*, F. gora) do 11.98  $\mu g/mL$  (*P. major*, Zlatar) i ukazuju da ekstrakti imaju bolju sposobnost neutralizacije  $DPPH^{\bullet}$  radikala nego sintetički antioksidant BHA ( $IC_{50} = 12.35 \mu g/mL$ ). Takođe, statistički značajno bolju aktivnost ( $p < 0.05$ ) od BHT pokazalo je dvanaest ekstrakata, čije  $IC_{50}$  vrednosti su bile manje od 8.38  $\mu g/mL$  ( $IC_{50}$  butilovanog hidroksitoluena).

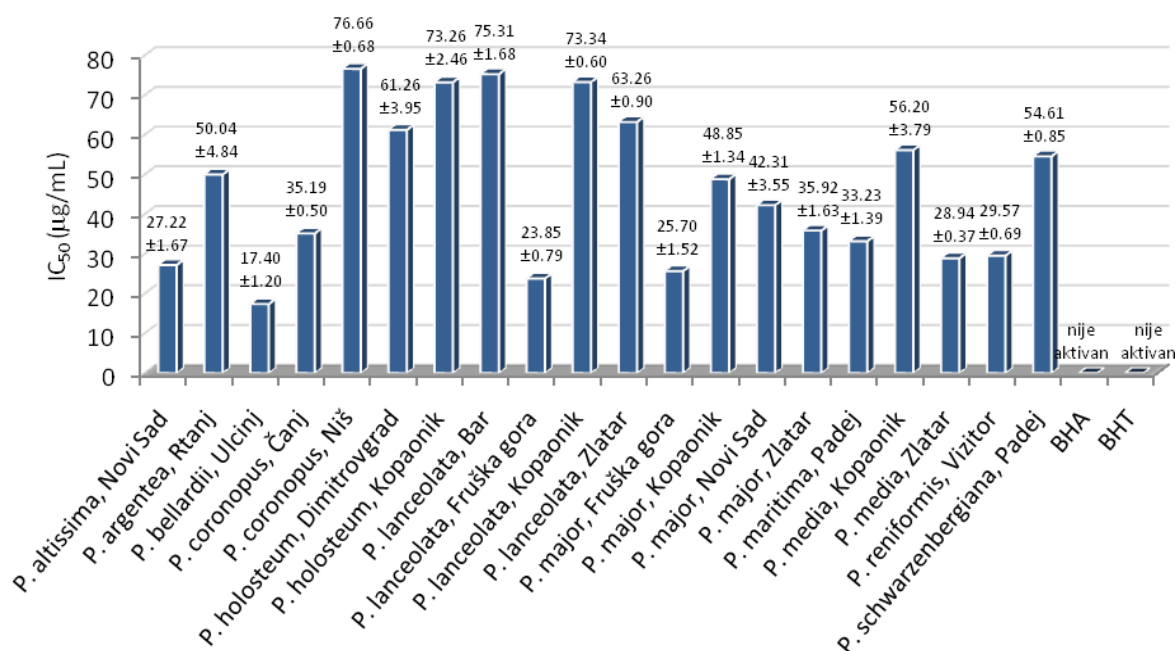
U pogledu sposobnosti „hvatanja“ HO<sup>•</sup> radikala, svi ekstrakti su pokazali značajnu aktivnost (*Histogram 4.9.*).



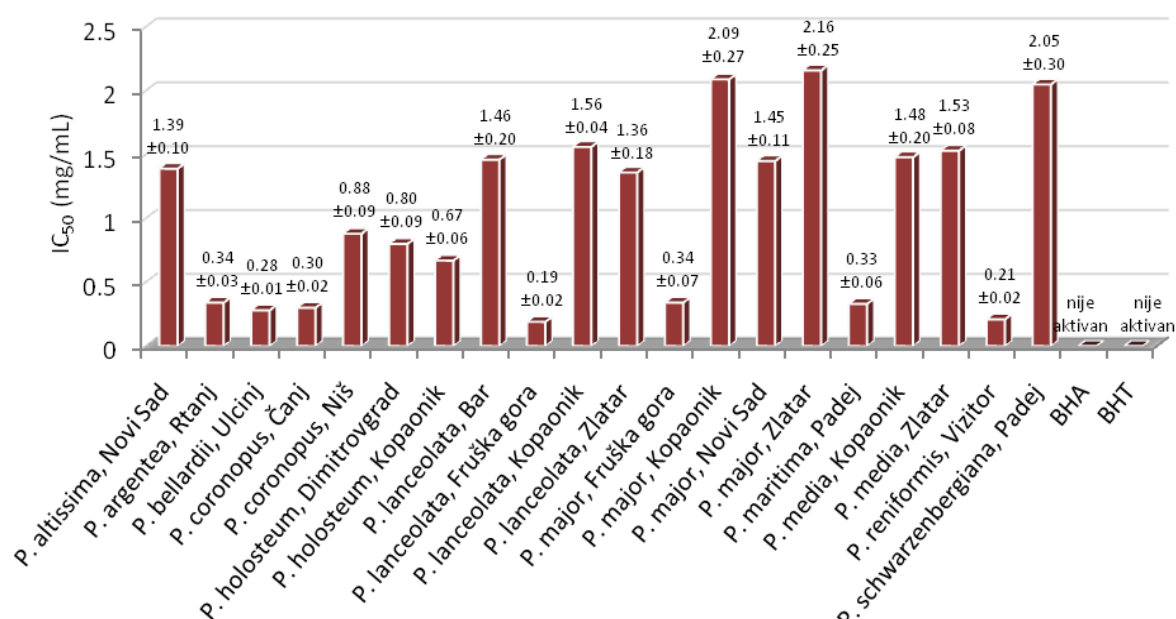
*Histogram 4.9. Potencijal „hvatanja“ HO<sup>•</sup> radikala*

Ekstrakti *P. argentea*, Rtanj (IC<sub>50</sub> = 120.47 µg/mL), *P. coronopus*, Niš (IC<sub>50</sub> = 133.86 µg/mL), *P. holosteum*, Dimitrovgrad (IC<sub>50</sub> = 164.48 µg/mL), *P. holosteum*, Kopaonik (IC<sub>50</sub> = 127.19 µg/mL), *P. lanceolata*, Kopaonik (IC<sub>50</sub> = 206.80 µg/mL), *P. lanceolata*, Zlatar (IC<sub>50</sub> = 124.15 µg/mL), *P. major*, Kopaonik (IC<sub>50</sub> = 204.99 µg/mL), *P. major*, Zlatar (IC<sub>50</sub> = 144.14 µg/mL), *P. maritima*, Padej (IC<sub>50</sub> = 187.98 µg/mL) i *P. schwarzenbergiana*, Padej (IC<sub>50</sub> = 181.60 µg/mL), pokazali su bolju sposobnost „hvatanja“ HO<sup>•</sup> radikala nego BHT (IC<sub>50</sub> = 220.04 µg/mL). Međutim, ekstrakti *P. coronopus*, Čanj (IC<sub>50</sub> = 324.85 µg/mL) i *P. major*, Fruška gora (IC<sub>50</sub> = 338.60 µg/mL) bili su neznatno manje aktivni od BHA (IC<sub>50</sub> = 320.12 µg/mL).

Kapacitet „hvatanja“ superoksid anjon radikala ispitivanih ekstrakata prikazan je na *Histogramu 4.10.* Najveći potencijal „hvatanja“ O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radikala pokazao je ekstrakt *P. bellardii*, Ulcinj dostižući IC<sub>50</sub> vrednost pri koncentraciji od 17.40 µg/mL, dok je najmanju aktivnost ispoljio ekstrakt *P. coronopus*, Niš (IC<sub>50</sub> = 76.66 µg/mL). Pri radnoj koncentraciji od 2.5 do 40 µg/mL ni BHA ni BHT nisu pokazali koncentraciono zavisnu aktivnost, što je najverovatnije posledica njihove slabe rastvorljivosti u vodi (puferskim sistemima).

Histogram 4.10. Potencijal „hvatanja“ O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radikala

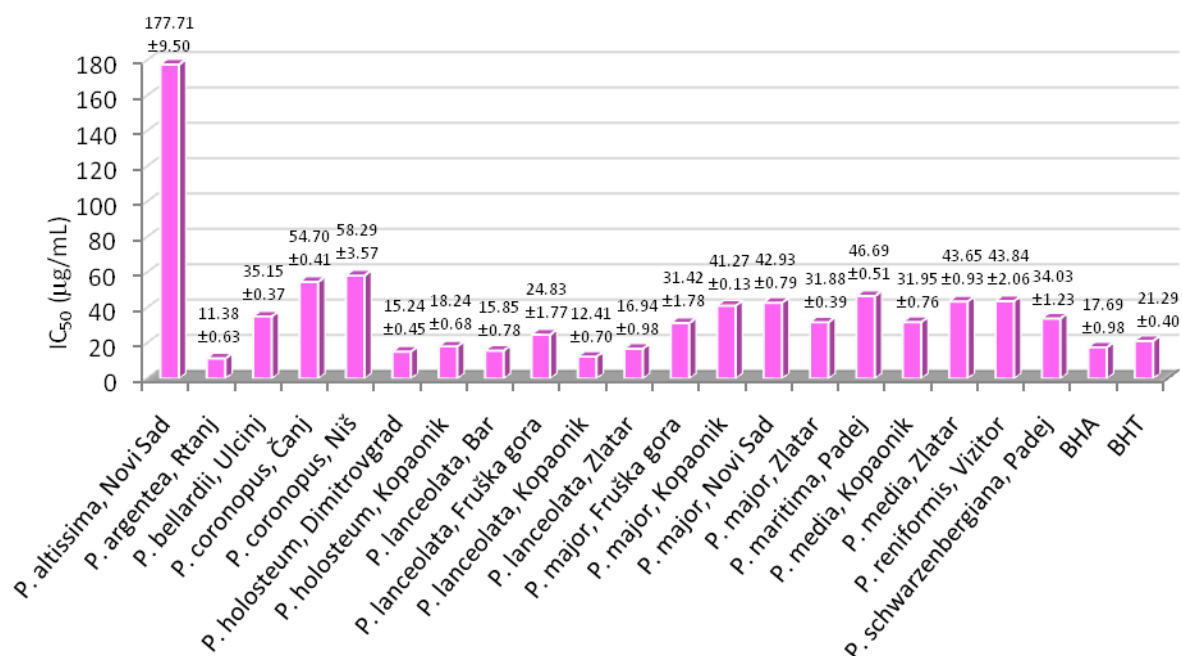
Kapacitet „hvatanja“ NO<sup>•</sup> radikala ispitanih ekstrakata pri neutralizaciji NO<sup>•</sup> radikala prikazan je na *Histogramu 4.11*.

Histogram 4.11. Potencijal „hvatanja“ NO<sup>•</sup> radikala

Kao i pri neutralizaciji O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radikala, ni BHA ni BHT nisu pokazali koncentraciono zavisnu aktivnost (radna koncentracija od 0.1 do 3.0 mg/mL) pri neutralizaciji NO<sup>•</sup> radikala. Međutim, ekstrakti su pokazali znatan potencijal postizući IC<sub>50</sub> vrednosti u

rasponu koncentracija od 0.19 (*P. lanceolata*, Fruška gora) do 2.16 mg/ mL (*P. major*, Zlatar).

Potencijal ispitivanih ekstrakata da inhibiraju lipidnu peroksidaciju prikazan je na *Histogramu 4.12*.

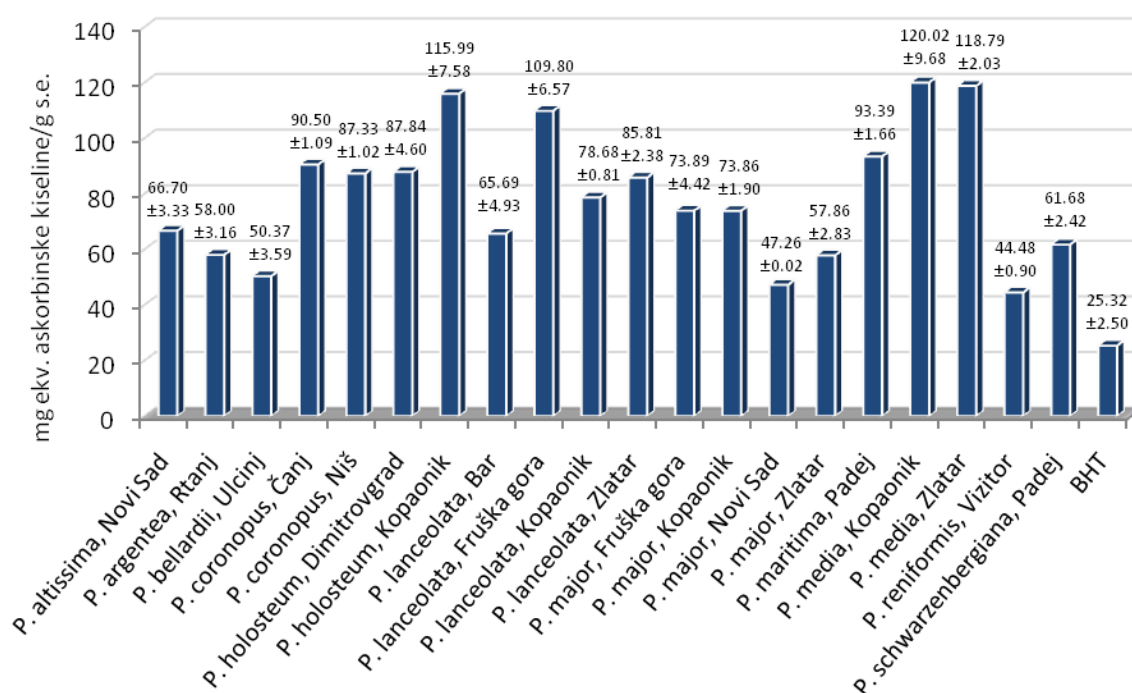


*Histogram 4.12.* Potencijal inhibicije lipidne peroksidacije

Ekstrakti *P. argentea*, Rtanj (IC<sub>50</sub> = 11.38 µg/mL), *P. holosteum*, Dimitrovgrad (IC<sub>50</sub> = 15.24 µg/mL) i *P. lanceolata*, Zlatar (IC<sub>50</sub> = 16.94 µg/mL) postigli su niže, dok su ostali ekstrakti, osim *P. altissima*, Novi Sad (IC<sub>50</sub> = 177.71 µg/mL), postigli neznatno više IC<sub>50</sub> vrednosti (od 18.24 µg/mL za *P. holosteum*, Kopaonik do 58.29 µg/mL *P. coronopus*, Niš) od BHA i BHT (IC<sub>50</sub> = 17.69 i 21.29 µg/mL).



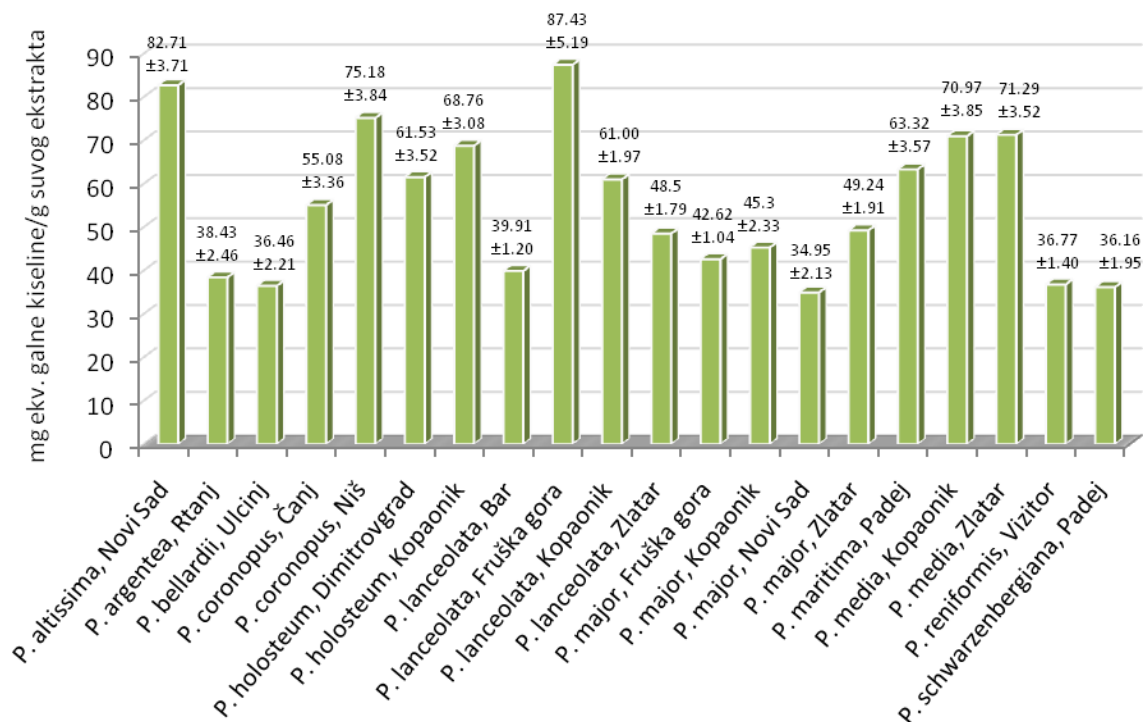
Rezultati određivanja redukcionog potencijala ispitivanih ekstrakata, izraženi u mg ekvivalenata askorbinske kiseline/g suvog ekstrakta, prikazani su na *Histogramu 4.13*.



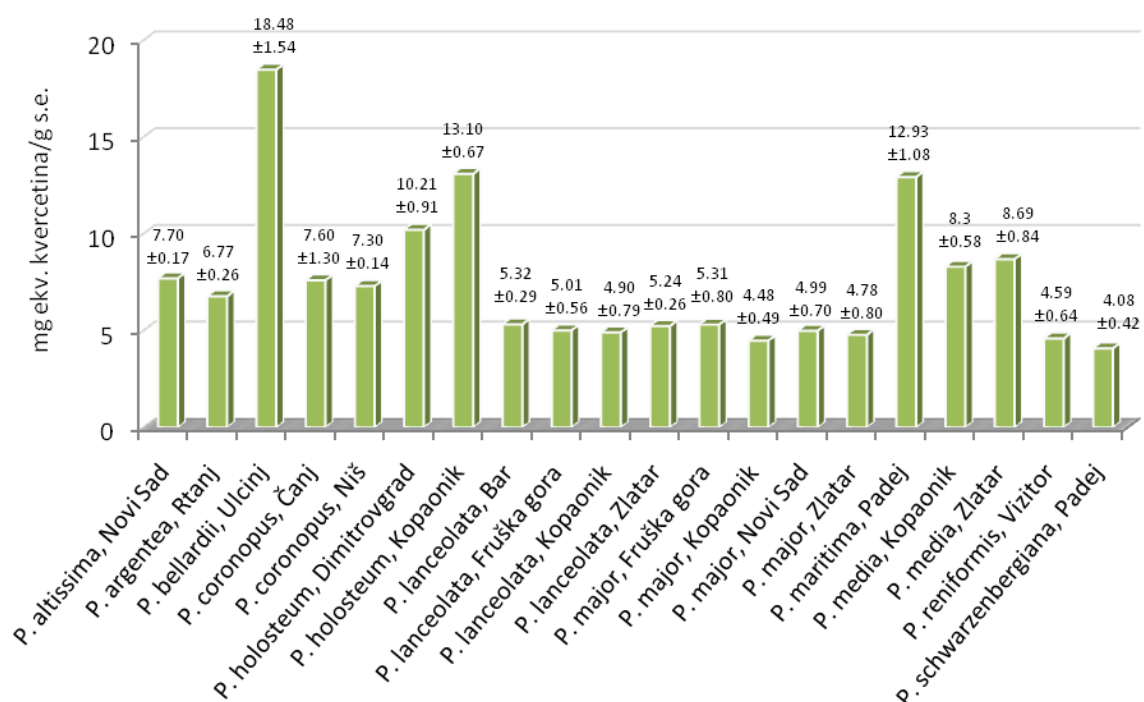
*Histogram 4.13.* Redukcioni potencijal ispitanih ekstrakata izražen u mg ekvivalenata askorbinske kiseline/g suvog ekstrakta

Redukcioni potencijal ispitanih ekstrakata bio je dva do pet puta veći od redukcionog potencijala BHT. Naime, svi ekstrakti su pokazali visoku sposobnost inhibicije redukcije  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ kompleksa, koja je iznosila od 44.48 (*P. reniformis*, Vizitor) do 120.02 mg ekv. askorbinske kis/g s.e. (*P. media*, Kopaonik), odnosno 25.32 mg ekv. askorbinske kis/g za BHT.

Smatra se da je antioksidantna aktivnost biljnih ekstrakata zavisna od ukupnog sadržaja fenola i flavonoida, potentnih prirodnih antioksidantnih agenasa. Određivanje sadržaja ovih jedinjenja (*Histogramimi 4.14. i 4.15.*) urađeno je u cilju ispitivanja korelacije sa utvrđenim antioksidantnim potencijalom.



Histogram 4.14. Sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim uzorcima izražen u mg ekv. galne kiseline/g suvog ekstrakta



Histogram 4.15. Sadržaj ukupnih flavonoida u ispitivanim uzorcima izražen u mg ekv. kvercetina/g suvog ekstrakta

Najmanji sadržaj fenola (34.95 mg ekv. galne kiseline/g s. e.) utvrđen je u ekstraktu *P. major*, Novi Sad, a najveći (87.43 mg ekv. galne kiseline/g s. e.) u ekstraktu

*P. lanceolata*, Fruška gora. Najmanji sadržaj flavonoida (4.08 mg ekv. kvercetina/g s. e.) određen je u ekstraktu *P. schwarzenbergiana*, Padej, a najveći (18.48 mg ekv. kvercetina/g s. e.) u *P. bellardii*, Ulcinj. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima (Maksyutina, 1971b; Haznagy i sar., 1976; Lebedev-Kosov i sar., 1978; Kawashty i sar., 1994; Nishibe i sar., 1995; Gálvez i sar., 2003; Jurišić-Grubešić i Vladimir-Knežević, 2004; Gálvez i sar., 2005a; Gálvez i sar., 2005b; Pourmorad i sar., 2006; Heimler i sar., 2007; Murai i sar., 2008) koji ukazuju na visok sadržaj fenolne, odnosno flavonoidne klase jedinjenja u vrstama roda *Plantago*.

Uzimajući u obzir dobijene rezultate, primenom regresione analize izračunati su korelacioni faktori između ukupnog sadržaja fenola, odnosno flavonoida i antioksidantnih aktivnosti, izraženih kao recipročne vrednosti izračunatih  $IC_{50}$ , osim u slučaju redoks potencijala gde su korišćene direktne vrednosti (Tabela 4.1.).

Tabela 4.1. Korelacioni faktor ( $R^2$ ) između ukupnog sadržaja fenola i flavonoida i antioksidantne aktivnosti

	Korelacioni faktor ( $R^2$ )					
	Kapacitet „hvatanja“ radikala				Lipidna peroksidacija	Redukcioni potencijal
	DPPH <sup>•</sup>	HO <sup>•</sup>	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	NO <sup>•</sup>		
Ukupni fenoli	0.9317	0.8274	0.7634	0.5409	0.6473	0.9608
Ukupni flavonoidi	0.7823	0.7481	0.7898	0.5618	0.5798	0.7917

Visok stepen korelacije uočava se između sadržaja ukupni fenola i sposobnosti „hvatanja“ DPPH<sup>•</sup> radikala i redukcionog potencijala ( $R^2 = 0.9317$  i  $0.9608$ ), što ukazuje na to da pri neutralizaciji slobodnih radikalskih vrsta, kada se ona odvija po mehanizmu transfera elektrona tj. redukcije, fenolna jedinjenja imaju ključnu ulogu. Manje vrednosti ovih faktora ( $R^2 = 0.7823$  i  $0.7917$ ) utvrđene su između sadržaja ukupnih flavonoida u ekstraktima i navedenih antioksidantnih aktivnosti, ukazujući da sadržaj flavonoida utiče na nivo slobodnoradikalske neutralizacije (redukcije), ali da nije u direktnoj korelaciji. Ovi rezultati su u skladu sa podacima da se u vrstama roda *Plantago* nalaze i drugi tipovi fenolnih jedinjenja, poput derivata kafene kiseline (Maksyutina, 1971a; Andary i sar., 1988; Murai i sar., 1995; Franzyk i sar., 1998; Rønsted i sar., 2000; Egorov i sar., 2004), koji, pored flavonoida, takođe mogu da učestvuju u ovom tipu reakcija i doprinose ukupnoj antioksidantnoj aktivnosti. U pogledu sposobnosti „hvatanja“ HO<sup>•</sup> i O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radikala, utvrđena je dobra korelacija ( $R^2$  od 0.7481 do 0.8274), koja ukazuje na značajnu aktivnost

fenola i flavonoida u ovim procesima. Međutim, korelacioni faktori između sadržaja ukupnih fenola i flavonoida i sposobnosti „hvatanja“ NO<sup>•</sup> radikala su niski (0.5409 i 0.5618), što može biti posledica aktivnosti drugih klasa jedinjenja prisutnih u ovim vrstama (askorbinska kiselina, vitamin K ili karotenoidi; Samuelsen, 2000), kao i osetljivosti same metode (uticaj svetlosti, temperature). Takođe, nizak stepen korelacije utvrđen je između sadržaja ukupnih fenola i flavonoida i potencijala lipidne peroksidacije ( $R^2 = 0.6473$  do  $0.5798$ ). Pored već navedenog uticaja drugih klasa jedinjenja, i sama metoda koja se primenjuje za određivanje inhibicije lipidne peroksidacije ima nekoliko nedostataka koji mogu uticati na stepen korelacije. Naime, prisustvo Fe-helatacionih agenasa u ekstraktima može da utiče na Fentonovu reakciju, a TBA metoda korišćena za detekciju malonil dialdehida (MDA), jednog od krajnjih proizvoda lipidne peroksidacije, nije specifična ni dovoljno osetljiva za ovaj proizvod, jer i druga, strukturno slična jedinjenja, uglavnom dialdehidi i ugljeni hidrati, čije prisustvo je potvrđeno u vrstama roda *Plantago* (Samuelsen i sar., 1995; Samuelsen i sar., 1999; Kardošová i Machová, 2006) takođe mogu da reaguju sa TBA.

Analizom dobijenih rezultata, pri čemu je za rangiranje korišćen relativni odnos IC<sub>50</sub> vrednosti ispitivanih ekstrakata i najpotentnijeg od njih, utvrđen je sledeći odnos ukupne antioksidantne aktivnosti: *P. lanceolata*, Fruška gora > *P. argentea*, Rtanj > *P. holosteuum*, Kopaonik > *P. bellardii*, Ulcinj > *P. coronopus*, Čanj > *P. holosteuum*, Dimitrovgrad > *P. maritima*, Padej > *P. lanceolata*, Zlatar > *P. major*, Fruška gora > *P. media*, Zlatar > *P. lanceolata*, Kopaonik > *P. media*, Kopaonik > *P. reniformis*, Vizitor > *P. coronopus*, Niš > *P. major*, Zlatar > *P. lanceolata*, Bar > *P. major*, Kopaonik > *P. schwarzenbergiana*, Padej > *P. major*, Novi Sad > *P. altissima*, Novi Sad. U većini primenjenih testova, najpotentniji ekstrakti bili su svega nekoliko puta jači antioksidantni agensi od najmanje aktivnog ekstrakta, što ukazuje na malu razliku u antioksidantnom potencijalu različitih vrsta. Iako dobijeni podaci pokazuju da ne postoji jasna korelacija između antioksidantne aktivnosti istih vrsta sa različitih lokaliteta, vrste *P. lanceolata*, *P. argentea* i *P. holosteuum* bi mogle biti okarakterisane kao najpotentnije.

Uopšteno, podataka o antioksidantnom potencijalu vrsta roda *Plantago* ima vrlo malo i za samo četiri vrste (*P. bellardii*, *P. coronopus*, *P. lanceolata*, *P. major*), od ispitanih jedanaest, postoje literaturnih navodi (Çoban i sar., 2003; Herold i sar., 2003; Gálvez i sar., 2005b; Gálvez i sar., 2005a; Pourmorad i sar., 2006; Katalinić i sar., 2006; Al-Mamun i sar., 2007; Heimler i sar., 2007; Stanisavljević i sar., 2008; Souri i sar., 2008). Dobijeni rezultati pokazuju da su sve ispitane vrste potentni antioksidantni agensi,

odnosno da mogu da utiču na sprečavanje slobodnoradikalnih procesa zasnovanih na transferu elektrona, neutralizaciji slobodnoradikalnih vrsta ili da inhibiraju lipidnu peroksidaciju i da postoji izvestan stepen korelacije između sadržaja fenola, odnosno flavonoida u ispitanim ekstraktima i navedenih antioksidantnih aktivnosti. Takođe, dobijeni rezultati potvrđuju da su ispitane vrste roda *Plantago* potencijalni izvor prirodnih proizvoda, koji mogu biti potentni antioksidantni agensi.

### 4.3. Antiinflamatorna aktivnost

I pored niza *in vitro* metoda razvijenih u cilju određivanja COX-1/COX-2 ili 12-LOX aktivnosti (Poglavlje 2.4.1. i 2.4.2.), *in vivo* testovi za određivanje antiinflamatorne aktivnosti se još uvek često primenjuju. Najčešće korišćene *in vivo* metode za ispitivanje akutne inflamacije, boli ili povišene telesne temperature podrazumevaju karaginan-indukovane inflamacije edema i hiperalgezije u šapi pacova ili uhu miševa i endotoksinima indukovanu povišenu telesnu temperaturu (Chan, 2003; Gierse i sar., 2008). Za *in vivo* praćenje hroničnih inflamacija primenjuju se modeli adjuvant ili kolagen indukovano artritisa kod pacova (Connor i sar., 1995; Helyes, 2004). Takođe, uloga 12-LOX u progresiji određenih bolesti, određena je testovima indukcije tumora kod eksperimentalnih miševa (Piao, 2008), ili Matrigel implantacionom metodom angiogeneze (Nie i sar., 2000).

Sa namerom da izbegnemo neželjene *in vivo* eksperimente, koji su danas u većini zemalja zabranjene, ova ispitivanja su bila usmerena ka razvijanju *in vitro* metode koja će pružiti mogućnost efikasnog određivanja antiinflamatorne aktivnosti kako biljnih ekstrakata, tako i izolovanih prirodnih proizvoda. Pri odabiru osnovnih principa metode, tri najvažnija eksperimentalna uslova su bila:

- izvor COX-1 i 12-LOX enzima
- način indukcije inflamacije
- način detekcije metabolita

Iako su izolovani COX-1 i 12-LOX enzimi komercijalno dostupni, njihova upotreba najprikladnija je za proučavanje mehanizma interakcije supstrata i enzima na molekulskom nivou. Sa druge strane, određene klase jedinjenja, poput fenola, prisutnih u

biljnim ekstraktima, mogu biti elektron-donori i oksidovati se u hidroperoksidaznoj fazi biosinteze prostaglandina, što može da rezultuje aktivacijom, a ne inaktivacijom ciklooksigenaze. Ovaj uticaj može biti izbegnut korišćenjem adrenalina kao kofaktora ili intaktnog ćelijskog sistema, jer normalna ćelija poseduje visoki stepen peroksidaznog potencijala (Hostettmann, 1991). Pri upotrebi trombocita kao biološkog supstrata za ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti postižu se fiziološki uslovi prisutni u ćelijskim sistemima, a takođe je moguće i simultano praćenje aktivnosti i COX-1 i 12-LOX, budući da se oba enzima nalaze u njima.

Indukcijom inflamacije pomoću kalcijumove jonofore A23187 (kalcimicina), izbegava se dodavanje egzogene, najčešće [ $^{14}\text{C}$ ]-arahidonske kiseline, a samim tim i primena radiohemijskih metoda za detekciju nastalih proizvoda. Takođe, na ovaj način, omogućena je biosinteza metabolita endogene arahidonske kiseline.

Detekcija i kvantifikacija eikozanoidnih jedinjenja najčešće se vrši hromatografskim metodama: tačnom hromatografijom visoke moći razdvajanja (HPLC) i gasno-masenom hromatografijom (GC/MS), ali i enzimskim i radio-imuno metodama (EIA i RIA). Iako su EIA i RIA znatno osetljivije metode od HPLC-a i GC/MS-a, njihov nedostatak je to što su ograničene na detekciju samo jednog, ciljanog proizvoda, dok se pri HPLC i GC/MS analizi može simultano pratiti više jedinjenja. Takođe, jedinjenja koja se analiziraju GC/MS tehnikom moraju biti volatilna i termostabilna, što iziskuje derivatizaciju većine eikozanoida. Međutim, primena tačne hromatografije sa tandemskom masenom spektroskopijom (LC-MS/MS) pruža mogućnost kvantifikacije velikog broja eikozanoida u različitim biološkim materijalima. Nakon HPLC razdvajanja komponenti na osnovu njihovih fizičkih karakteristika, identifikacija i kvantifikacija se postiže praćenjem karakterističnih jona-proizvoda u MS modu. Uopšteno, ovom metodom može se postići brza, osetljiva i selektivna analiza odabranih jedinjenja (Lundström i sar., 2009), zbog čega je ona i odabrana za praćenje odgovarajućih COX-1 i 12-LOX metabolita arahidonske kiseline.

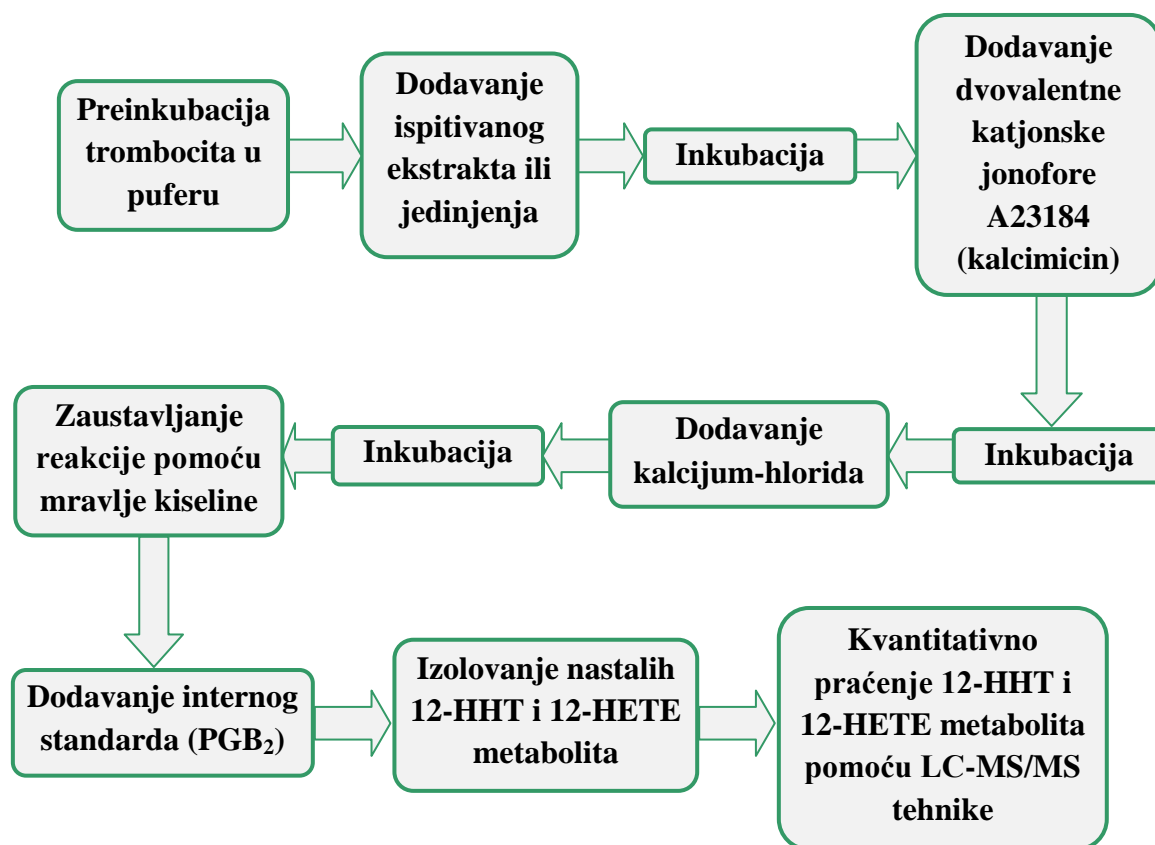
Uzimajući u obzir odabrane eksperimentalne uslove, literaturno je poznato nekoliko *in vitro* metoda za praćenje COX-1 i 12-LOX aktivnosti zasnovanih na sličnim principima. Međutim, iako različite grupe istraživača primenjuju humane trombocite kao intaktni ćelijski sistem, načini indukcije inflamacije i kvantifikacije nastalih metabolita su drugačiji:

- Nakatsuka i Osawa (1994) ispitivali su uticaj L-arginina i natrijum-nitroprusida na inhibiciju COX-1 i 12-LOX u intaktnim humanim trombocitima. Koristili su humane trombocite, egzogenu [ $^{14}\text{C}$ ]-arahidonsku kiselinu, ispitivana jedinjenja, a aktivnost enzima određena je praćenjem  $\text{TXB}_2$ , 12-HHT,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  i  $\text{PGD}_2$  (COX-1) metabolita, odnosno 12-HPETE i 12-HETE (12-LOX) metabolita [ $^{14}\text{C}$ ]-arahidonske kiseline pomoću HPLC-a sa radiohemijskim detektorom.
- Schneider i saradnici (2004) primenili su standardni test za određivanje 12-LOX inhibicije, koristeći humane trombocite i redukovani glutation, ispitivani ekstrakt ili jedinjenja i egzogenu arahidonsku kiselinu. 12(S)-HETE metabolit kvantifikovan je pomoću EIA (Correlate-EIA-12(S)-HETE-kit) ili RP-HPLC-UV tehnikom.
- Safayhi i saradnici (1992) su ispitujući aktivnost bosvelinskih kiselina pri inhibiciji 5-LOX, ciklooksigenaze i 12-LOX, kao i nastajanja leukotriena, koristili takođe humane trombocite, ali stimulisane kalcijumom i kalcijumovom jonoforom A23187 (kalcimicin). Inhibicija COX-1 i 12-LOX određivana je praćenjem koncentracija 12-HHT i 12-HETE, proizvoda COX-1 i 12-LOX metaboličkog puta endogene arahidonske kiseline, pomoću RP-HPLC-UV tehnike. Istu metodu primenjuju i Ammon i saradnici (1993) pri ispitivanju mehanizma antiinflamatornog dejstva kurkumina i bosvelinske kiseline.

Iako se navedeni testovi primenjuju za određivanje aktivnosti COX-1 i 12-LOX u humanim trombocitima, prikazana ispitivanja su bila usmerena ka prilagođavanju eksperimentalnih uslova za ispitivanje antiinflamatornog potencijala biljnih ekstrakata i razvijanju LC-MS/MS metode za detekciju nastalih metabolita. Ove modifikacije podrazumevale su utvrđivanje odgovarajućeg odnosa broja trombocita i koncentracije aktivirajućih jedinjenja u cilju dobijanja detektibilne količine 12-HHT i 12-HETE, zatim optimizaciju faze njihovog izolovanja (ekstrakcije) i naposljetku određivanje LC-MS/MS parametara. Opšta šema eksperimentalnog postupka, primenjenog za *in vitro* određivanje COX-1 i 12-LOX inhibitorne aktivnosti prikazana je na *Slici 4.4*.

Naime, eksperimentalni put podrazumevao je preinkubaciju tačno određenog broja trombocita u puferu, dodavanje ispitivanog ekstrakta ili jedinjenja, a zatim inkubaciju. Izazivanje inflamatornog odgovora podstiče se sukcesivnim dodatkom kalcimicina i kalcijum-hlorida, a nakon inkubacije, reakcija se zaustavlja zakišeljavanjem. Kao interni

standard koristi se  $\text{PGB}_2$ , zbog fizičko-hemijske sličnosti sa 12-HHT i 12-HETE. Posle faze izolovanja nastalih metabolita i  $\text{PGB}_2$ , vrši se njihova kvantifikacija pomoću LC-MS/MS tehnike.



Slika 4.4. Eksperimentalni put određivanja inhibicije COX-1 i 12-LOX

Preparat humanih trombocita, koji su korišćeni kao intaktni ćelijski sistem za određivanje inhibicije COX-1 i 12-LOX enzima, pripreman je u Institutu za transfuziju krvi Vojvodine u Novom Sadu. Naime, koncentrat humanih trombocita se primenjuju kod bolesnika koji krvare zbog smanjenjenog broja sopstvenih trombocita ili zbog njihove poremećene funkcije. To su pacijenti na hemioterapiji ili radioterapiji, bolesnici koji pate od urođenih poremećaja funkcije trombocita, bolesnici preosetljivi na neke lekove, u bolestima kao što je uremija, zatim pri operacijama na otvorenom srcu i sl. Trombociti se čuvaju na temperaturi  $22^{\circ}\text{C}$  (temperatura sobe) do 5 dana. Oni se prilikom čuvanja drže na specijalnim inkubatorima-tresilicama koje ih neprekidno mešaju kako bi se sprečila njihova spontana agregacija tokom stajanja. Budući da se koncentracije trombocita ne podvrgavaju bilo kakvim postupcima za uništavanje virusa, a usled čuvanja na sobnoj temperaturi u njima može doći do razmnožavanja bakterija i zato ih nikada ne treba



koristiti posle roka predviđenog za upotrebu ([www.nbti.org.rs/cms/view.php?id=136](http://www.nbti.org.rs/cms/view.php?id=136)). Međutim, u ovim ispitivanjima, korišćeni su i trombociti koji su zastareli za medicinsku upotrebu, odnosno koncentracije stariji od pet dana. Naime, pri istim eksperimentalnim uslovima, stepen aktivacije COX-1 i 12-LOX enzima, odnosno inhibicije ekstrakata i standardnih jedinjenja nije bio značajno promenjen ni kada su korišćeni trombociti starosti šest do osam dana, koji su i dalje bili vijabilni.

U cilju postizanja odgovarajućeg odgovora COX-1 i 12-LOX enzima na stimulaciju kalcimicinom, prvo je određen optimalan odnos broja trombocita i koncentracije aktivatora kalcimicina, odnosno kalcijum-hlorida, koji je vodio nastajanju adekvatne količine 12-HHT i 12-HETE metabolita, koja se mogla detektovati primenom LC-MS/MS tehnike. Ovaj odnos ispitan je u nekoliko sistema kontrolne probe, u koju nije dodat inhibitor, već odgovarajuća zapremina DMSO (100  $\mu$ L), pri čemu je osnovna procedura bila ista u svim postupcima (*Tabela 4.2.*).

*Tabela 4.2.* Optimizacija odnosa broja trombocita i koncentracije kalcimicina i  $\text{CaCl}_2$

Proba	Trombociti		Koncentracija aktivatora		12-HHT/PGB <sub>2</sub>		12-HETE/PGB <sub>2</sub>	
	Broj	Starost (dani)	Kalcimicin ( $\mu\text{mol/L}$ )	$\text{CaCl}_2$ (mmol/L)	srednja vrednost tri ponavljanja	korekcija	srednja vrednost tri ponavljanja	korekcija
1	$2.0 \times 10^8$	4	62.5	8.33	0.44	0.00	1.49	0.00
2	$2.0 \times 10^8$	5	62.5	8.33	0.16	0.00	0.96	0.00
3	$2.0 \times 10^8$	8	62.5	8.33	0.1	0.00	0.33	0.19
4	$1.25 \times 10^9$	4	57.0	14.58	0.30	0.00	2.84	0.00
5	$1.25 \times 10^9$	5	57.0	14.58	0.05	0.00	1.19	0.10
6	$1.25 \times 10^9$	8	57.0	14.58	0.14	0.00	3.18	1.25
7	$2.0 \times 10^8$	4	57.0	14.58	0.27	0.00	1.39	0.00
8	$2.0 \times 10^8$	5	57.0	14.58	0.10	0.00	0.69	0.00
9	$2.0 \times 10^8$	8	57.0	14.58	0.12	0.00	0.79	0.20
10	$2.0 \times 10^8$	4	62.5	8.33	0.1	0.00	0.30	0.00
11	$4.0 \times 10^8$	4	125.0	16.66	0.50	0.00	1.52	0.00
12	$2.0 \times 10^8$	4	100.0	13.33	0.15	0.00	0.43	0.00
13	$4.0 \times 10^8$	4	200.0	26.66	0.24	0.00	0.69	0.00
14	$1.25 \times 10^9$	7	57.0	14.58	0.05	0.00	0.98	0.31
15	$1.25 \times 10^9$	7	125.0	14.58	0.21	0.00	1.64	0.19
16	$1.25 \times 10^9$	7	200.0	14.58	0.34	0.00	2.06	0.24
17	$1.25 \times 10^9$	7	350.0	29.16	0.47	0.00	1.97	0.18

Budući da koncentracija trombocita u preparatu može biti različita, što zavisi od starosti trombocita, kao i od same pripreme preparata, nakon brojanja, alikvot koji sadrži potreban broj trombocita razblažuje se puferom do krajnje zapremine od 2.0 mL, čime se postiže ista početna koncentracija trombocita u svim probama, bez obzira na inicijalnu u preparatu. Zapremina kalcimicina iznosila je 100  $\mu$ L, kalcijum-hlorida 300  $\mu$ L, a količina internog standarda bila je 300 ng.

Na izbor optimalnog odnosa broja trombocita i koncentracije kalcimicina i kalcijum-hlorida uticala je količina nastalih 12-HHT i 12-HETE metabolita, ali i sama hromatografska analiza, pri čemu je uočeno da veće koncentracije kalcimicina (Probe 12., 13., 16. i 17.) mogu da izazovu aktivaciju i drugih enzima, što vodi ka nastajanju smeše različitih proizvoda, lošije rezolucije i simetrije pikova. U Probama 1-3. i 10. korišćen je poznati odnos ( $2.0 \times 10^8$  trombocita, 62.5  $\mu$ mol/L kalcimicin u DMSO i vodeni rastvor 8.33 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ ; Siemoneit i sar., 2008), pri čemu su detektovani 12-HHT i 12-HETE metaboliti, ali je analizom dobijenih hromatograma utvrđen loš odnos pik/šum za 12-HETE. U Probama 4-6. i 14. je povećan broj trombocita na  $1.25 \times 10^9$ , dok je, koncentracija kalcimicina (57.0  $\mu$ mol/L) snižena u cilju selektivne aktivacije COX-1 i 12-LOX, što je rezultovalo smanjenom količinom 12-HHT i neznatno povećanom količinom 12-HETE proizvoda. Sličan odnos metabolita dobijen je i u Probama 7-9., kada je  $2.0 \times 10^8$  trombocita aktivirano kalcimicinom koncentracije 57.0  $\mu$ mol/L. Međutim, kada je broj trombocita povećan na  $4.0 \times 10^8$ , uz kalcimicin koncentracije 125.0  $\mu$ mol/L i 16.66 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , dobijene su zadovoljavajuće količine 12-HHT i 12-HETE proizvoda, dobro okarakterisanih pikova.

U prikazanim rezultatima za Probe 1-3., odnosno 4-6. i 7-9. zapaža se i da, u zavisnosti od starosti trombocita, COX-1 i 12-LOX mogu da ispolje slabiju aktivnost, koja rezultuje umanjenom količinom odgovarajućih metabolita. Međutim, ova zavisnost može se uočiti samo kod preparata iste jedinice trombocita, odnosno jednog donora. Naime, u jedinicama trombocita različitih donora, čak i kada su one iste starosti, količina nastalih 12-HHT i 12-HETE metabolita može da varira, a utvrđeno je i da u nekim preparatima postoji inicijalna količina ovih proizvoda, koja je najverovatnije posledica inflamatornih procesa donora ili nastaje tokom stajanja preparata. Budući da se određivanje inhibitornog potencijala ekstrakata i standarda zasniva na izračunavanju  $\text{IC}_{50}$  vrednosti, odnosno na praćenju zavisnosti odnosa relativnog sadržaja nastalih proizvoda u radnoj probi (sa inhibitorom) i kontroli (bez inhibitora) od koncentracije inhibitora, ove promene aktivnosti

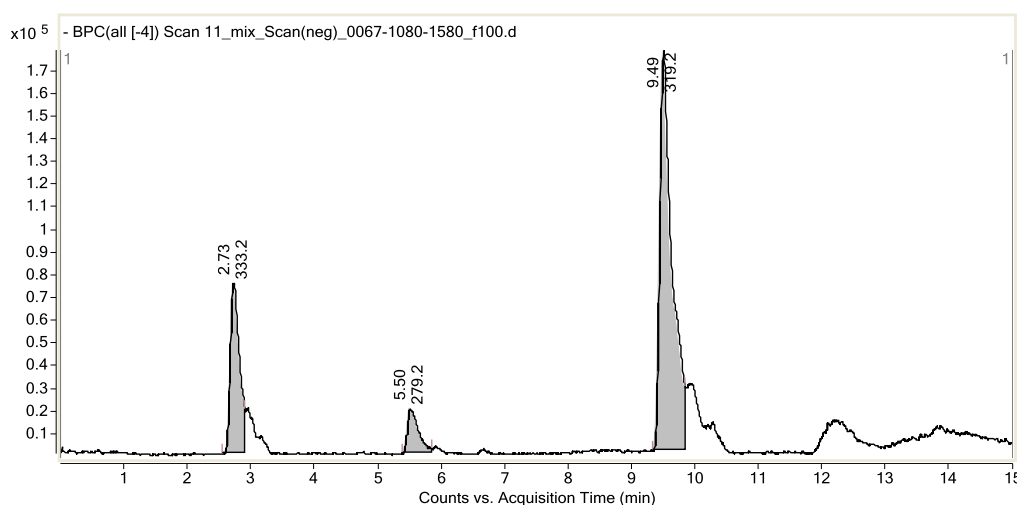
COX-1 i 12-LOX uzrokovane stajanjem trombocita i različitim poreklom, nemaju uticaj na krajnji rezultat. Da bi se izbegle moguće greške zbog prisustva inicijalnih količina 12-HHT i 12-HETE metabolita, za svaku probu urađena je korekcija, u kojoj nije izazvana aktivacija, jer su kalcimicin i  $\text{CaCl}_2$  zamenjeni odgovarajućim zapreminama DMSO i vode. Vrednosti 12-HHT/PGB<sub>2</sub> i 12-HETE/PGB<sub>2</sub> dobijene za radnu probu umanjene su za odgovarajuće vrednosti korekcije.

Zaustavljanje reakcije postignuto je zakišeljavanjem reakcione smeše do pH 3 (5.8 mL 1%  $\text{HCOOH}$ ). Međutim, nakon poslednje inkubacije (pre dodatka 1%  $\text{HCOOH}$ ) u probama koje su sadržale najčešće veće koncentracije biljnih ekstrakata, uočeno je formiranje gela, što je najverovatnije posledica prisustva polisaharida u ispitivanim vrstama (Samuelsen, 2000; Kardošová i Machová, 2006). Ove probe su prevedene u tečnu fazu snažnim mućkanjem (vorteks) tokom nekoliko minuta, nakon čega je reakcija stopirana. Da bi se izbeglo konstruisanje kalibracione krive za svaki standard i simultano kompenzovao uticaj matriksa, odnosno izbegle moguće greške pri kvantifikaciji, a koje nastaju usled gubitaka nastalih metabolita tokom faze izolovanja, korišćena je metoda dodatka internog standarda. Shodno tome, za određivanje količine metabolita tj. stepena inhibicije korišćen je relativni odnos površina pikova analita i internog standarda (PGB<sub>2</sub>).

Nastali metaboliti i PGB<sub>2</sub> ekstrahovani su smešom  $\text{CHCl}_3$ :MeOH 1:1 uz intenzivno mućkanje na vorteksu tokom 15 min. U fazi izolovanja, ispitano je nekoliko ekstrakcionih rastvora ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH 1:1→1:5) i metoda (ekstrakcija primenom ultrazvučnog kupatila ili vorteksa). Različiti sistemi za ekstrakciju nisu doprineli boljem razdvajanju reakcione faze od organskog sloja, što je na kraju postignuto centrifugiranjem 15 min na  $7012 \times g$  na 4°C. Nakon odvajanja i uparavanja organskog sloja, ostatak je rastvoren u 0.5 mL metanola, filtriran kroz membranski filter i analiziran LC-MS/MS tehnikom.

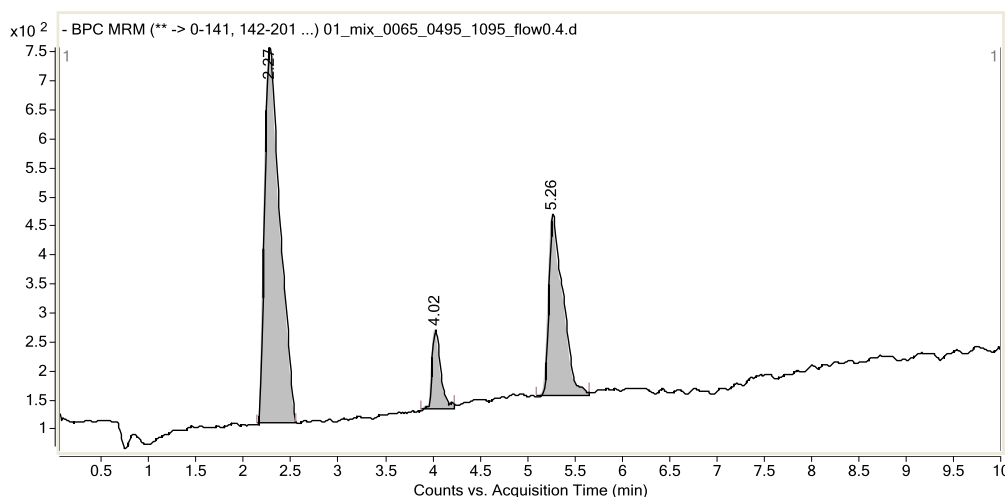
LC-MS/MS tehnika primenjena za determinaciju nastalih metabolita ima svojstva visoko osetljive i specifične metode sa kratkim vremenom analize. U ranijim radovima (Safayhi i sar., 1992; Takabatake i sar., 2002; Frohberg i sar., 2006) uglavnom je primenjivan izokratski mod eluiranja za razdvajanje eikozanoida, sa dugim vremenom analize (više od 60 min) i akumulacijom jedinjenja iz matriksa na koloni. Budući da su i neke metode sa gradijentnim modom eluiranja (Blewett i sar., 2008) i dalje vremenski zahtevne, ograničavajući faktor efikasnosti HPLC analize je njeno trajanje. U ovom radu, cilj je bio da se izokratsko eluiranje zameni gradijentnim, čime bi se postigla efikasnija analiza većeg broja uzoraka.

Mobilne faze korišćene u prethodnim radovima (Safayhi i sar., 1992; Takabatake i sar., 2002; Froberg i sar., 2006; Blewett i sar., 2008) sastojale su se od različitih odnosa vode i metanola ili acetonitrila, a zakišeljene su 0.01-0.6% (v/v) formijatnom ili sirćetnom kiselinom. U početnim fazama razvoja metode, izabrana je volatilna i ESI-kompatibilna mobilna faza (Safayhi i sar., 1992), koja se sastojala od 0.6% (v/v) sirćetne kiseline (A) i metanola (B). U cilju postizanja dobre rezolucije u najkraćem vremenskom roku, miks standarda, kao i same radne probe, analizirani su na različitim reverznofaznim kolonama, različitim temperaturama, protocima i gradijentima (eksperimentalni uslovi  $E_1$ - $E_5$ ), pri čemu su dobijeni hromatogrami prikazani na *Slikama 4.5.-4.9.*



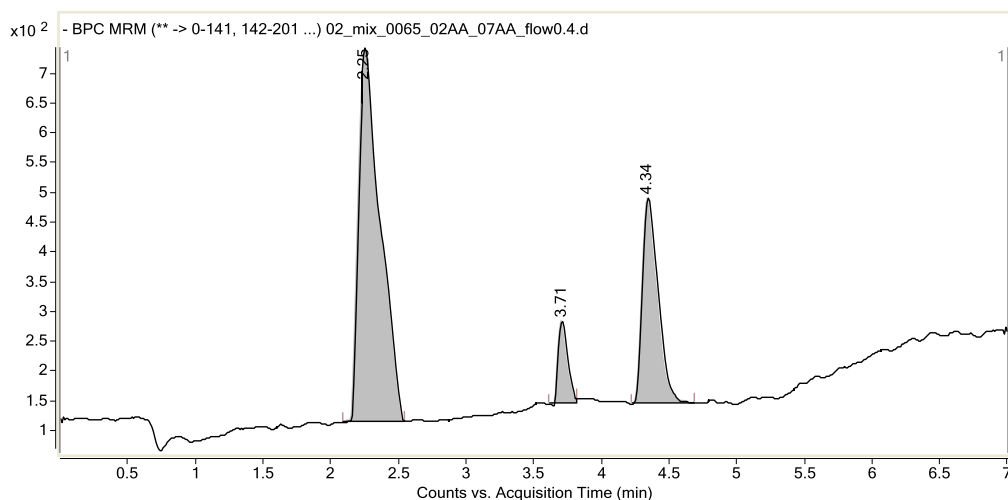
*Slika 4.5.* Hromatogram smeše standarda PGB<sub>2</sub>, 12-HHT i 12-HETE pri eksp. uslovima  $E_1$

Na koloni Zorbax SB-C18 100 mm × 2.1 mm × 1.8 μm (Agilent Technologies) pri temperaturi od 45°C, protoku mobilne faze od 0.4 mL/min u gradijentnom modu: 0 min 67% B, 10-15 min 80% B (eksperimentalni uslovi  $E_1$ ), postignuta je dobra rezolucija, ali uz neprihvatljivo dugo vreme analize (retenciono vreme: 4.09 min PGB<sub>2</sub>, 9.88 min 12-HETE, ukupno trajanje analize oko 20 min) i lošu simetriju pikova (tail-ovanje).



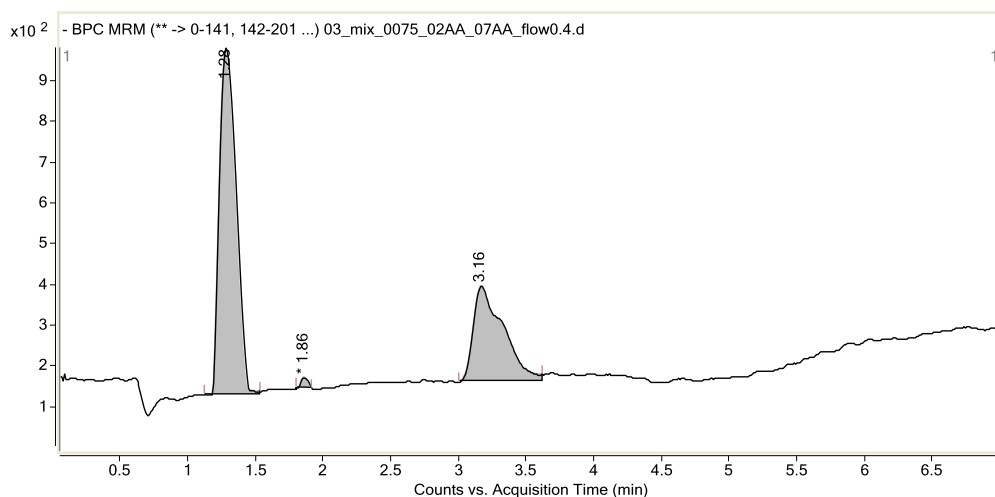
Slika 4.6. Hromatogram smeše standarda PGB<sub>2</sub>, 12-HHT i 12-HETE pri eksp. uslovima  $E_2$

Primenom kolone Zorbax SB-C18 Plus 30 mm  $\times$  2.1 mm  $\times$  1.8  $\mu$ m na 65°C, i bržim gradijentom (0 min 65% B, 4-10 min 95% B; eksp. uslovi  $E_2$ ; Slika 4.6.), postignuto je znatno kraće vreme analize (retenciono vreme: 2.27 min PGB<sub>2</sub>, 5.26 min 12-HETE).



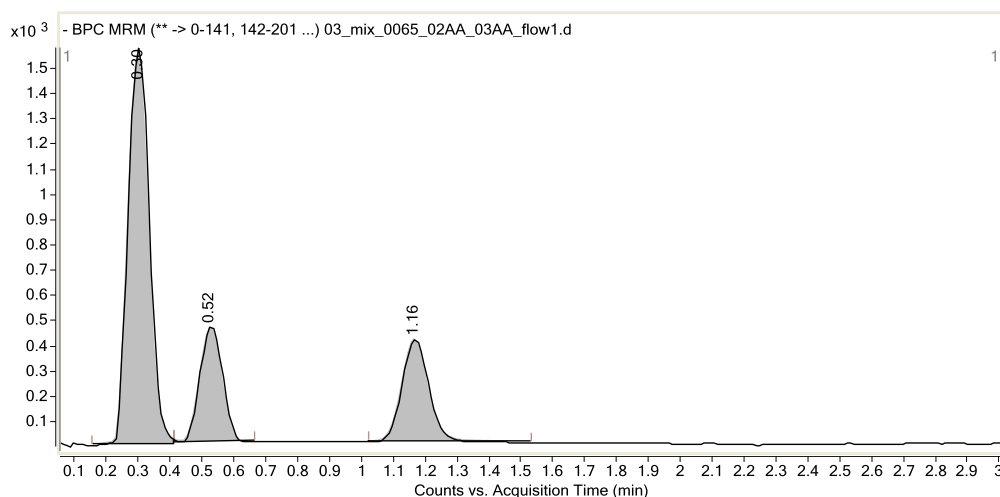
Slika 4.7. Hromatogram smeše standarda PGB<sub>2</sub>, 12-HHT i 12-HETE pri eksp. uslovima  $E_3$

Dalje menjanje gradijenta u cilju brže analize (0 min 65% B, 2-7 min 100% B) rezultovalo je pogoršanjem oblika pikova (eksp. uslovi  $E_3$ ; Slika 4.7.).



Slika 4.8. Hromatogram smeše standarda PGB<sub>2</sub>, 12-HHT i 12-HETE pri eksp. uslovima E<sub>4</sub>

Primena gradijenta 0 min 75% B, 2-7 min 100% B rezultovla je takođe pogoršanjem oblika pikova (eksp. uslovi E<sub>4</sub>; Slika 4.8.).



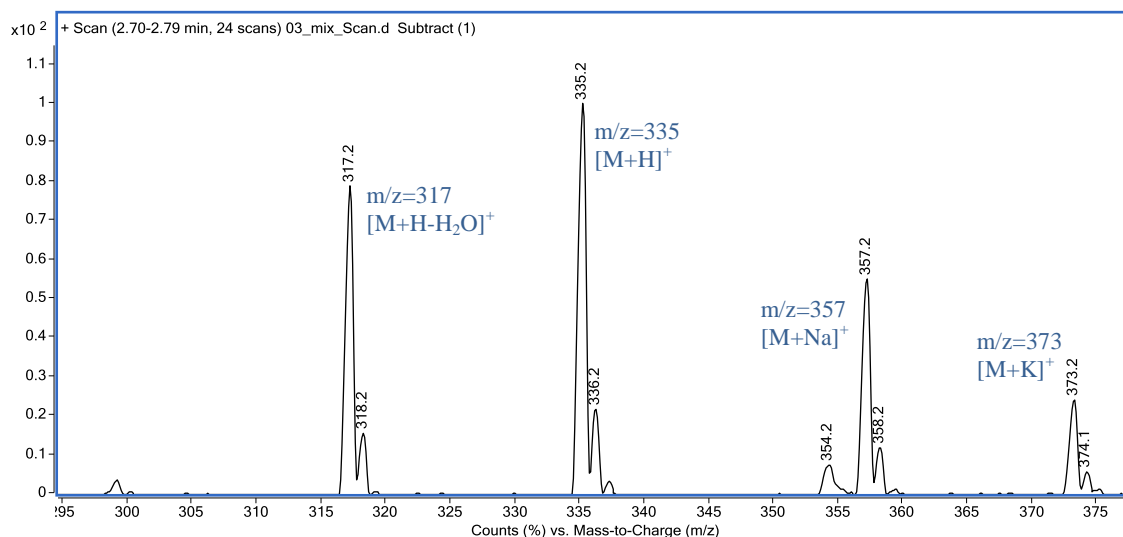
Slika 4.9. Hromatogram smeše standarda PGB<sub>2</sub>, 12-HHT i 12-HETE pri eksp. uslovima E<sub>5</sub>

Konačno, upotrebom kolone Zorbax SB-C18 30 mm × 2.1 mm × 3.5 μm na 65°C, uz protok mobilne faze od 1 mL/min pri gradijentu 0 min 65% B, 2-3.5 min 100% B, sa post-vremenom od 3 min, postignuta je zadovoljavajuća rezolucija i izgled pikova u toku prvih 1.5 min analize (retenciono vreme: 0.31 min PGB<sub>2</sub>, 0.56 min 12-HHT i 0.95 min 12-HETE), uz eluiranje ostalih komponenti matriksa (eksp. uslovi E<sub>5</sub>; Slika 4.9.). Injektovana zapremina svih uzoraka je bila 5 μL. Veće zapremine rezultirale su deformisanjem i cepanjem pikova (posledica činjenice da je rastvarač, metanol, jači eluens od početne

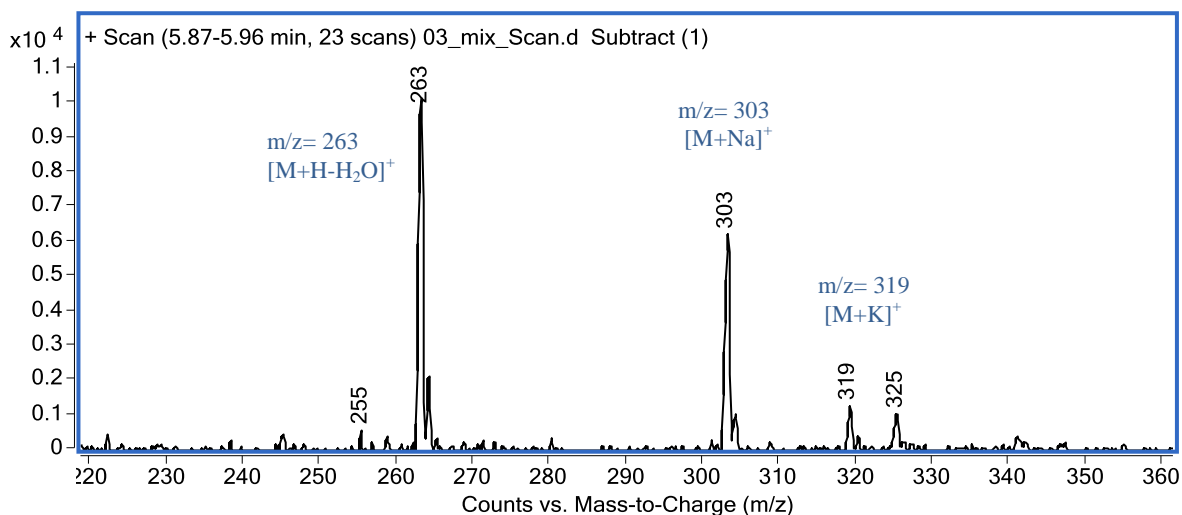
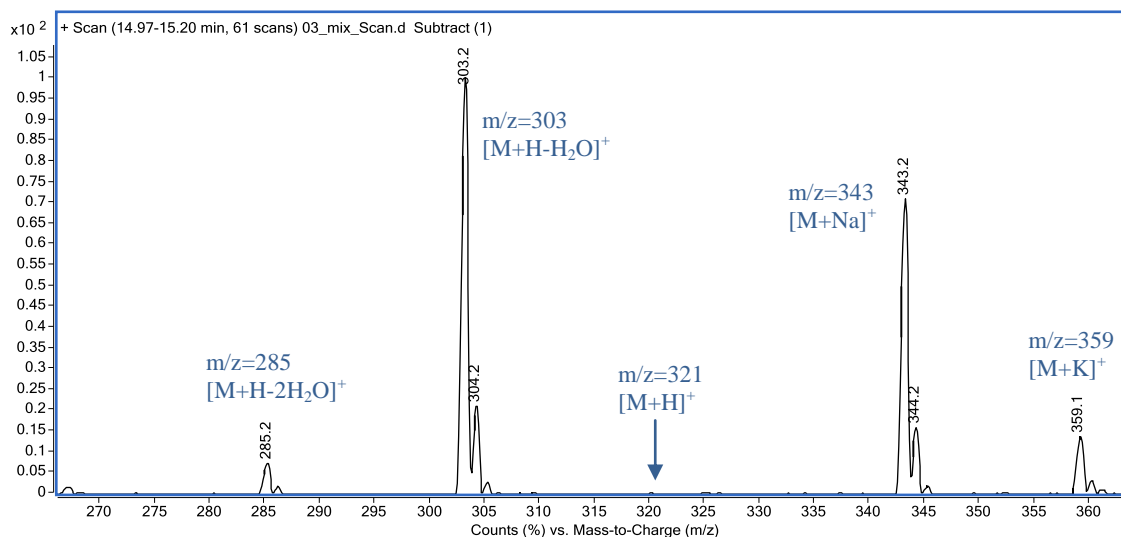
mobilne faze), dok se korišćenjem manjih zapremina smanjuje i osetljivost odnosno povećava granica detekcije metode.

Tandemska masena spektrometrija je izabrana za metodu detekcije, jer omogućava mnogo bolju osetljivost i selektivnost nego tradicionalni UV detektori i ne zavisi od prisustva hromofora u analitu. ESI parametri odabrani su na osnovu iskustva i ranijih eksperimenata: gas nebulajzer ( $N_2$ ) temperature  $350^\circ C$ , protok 9 L/min, pritisak 40 psi, napon na kapilari 4 kV. Standardna jedinjenja su analizirana i u pozitivnom i u negativnom modu. Negativna jonizacija odabrana je iz više razloga:

- u pozitivnom modu, pored željenog pseudomolekulskog jona  $[M+H]^+$  formiraju se i velike količine kompleksa sa alkalnim metalima –  $[M+Na]^+$  i  $[M+K]^+$  (Slike 4.10.-4.12); znatno teža fragmentacija ovih kompleksa, kao i činjenica da je koncentracija protonovanog oblika drastično smanjena i to u nereproduktivnom iznosu, onemogućava kvantitativno određivanje analita; u negativnom modu prisutan je samo  $[M-H]^-$  jon;
- jednostavnija fragmentacija koja rezultira manjim brojem produkata i samim tim boljom osetljivošću;
- niži nivo hemijskog šuma.



Slika 4.10.  $MS^1$  maseni spektar  $PGB_2$  (pozitivna jonizacija)

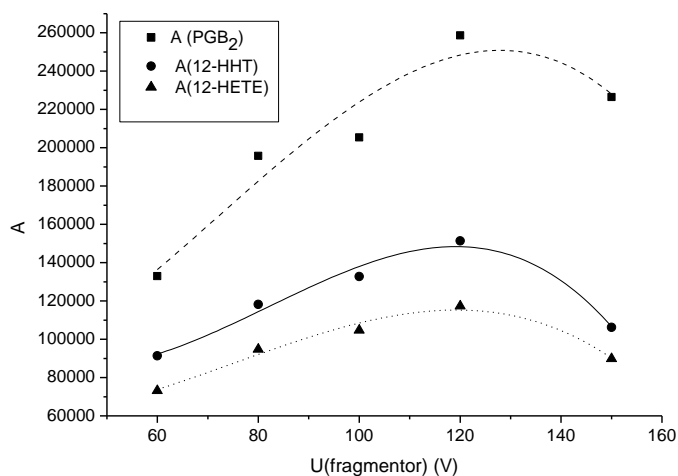
Slika 4.11. MS<sup>1</sup> maseni spektar 12-HHT (pozitivna jonizacija)Slika 4.12. MS<sup>1</sup> maseni spektar 12-HETE (pozitivna jonizacija)

Jedinjenja su kvantifikovana u MRM modu, koji je idealan za kvantitaciju, jer će signal dati samo jedinjenja željene molekulske mase koja fragmentacijom daju proizvode definisane molekulske mase, čime se postiže visoka selektivnost i vrlo nizak šum. MRM mod podrazumeva izolaciju željenog prekursora na prvom kvadrupolu (Q1), kolizijom indukovanu disocijaciju (CID) u kolizionoj ćeliji (Q2) i izolaciju željenog produkta na trećem kvadrupolu (Q3) QqQ MS-MS instrumenta. Definisanje odgovarajuće MRM metode obuhvatalo je optimizaciju napona fragmentora, izbor fragmenata i optimizaciju kolizijom indukovane disocijacije (CID).

*Optimizacija napona fragmentora* podrazumevala je izbor napona fragmentora (napon između kapilare i skimera) koji obezbeđuje potpunu desolvataciju jona, a ne rezultira fragmentacijom  $[M-H]^-$ . Miks standarda analiziran je u MS2SIM modu (praćeni



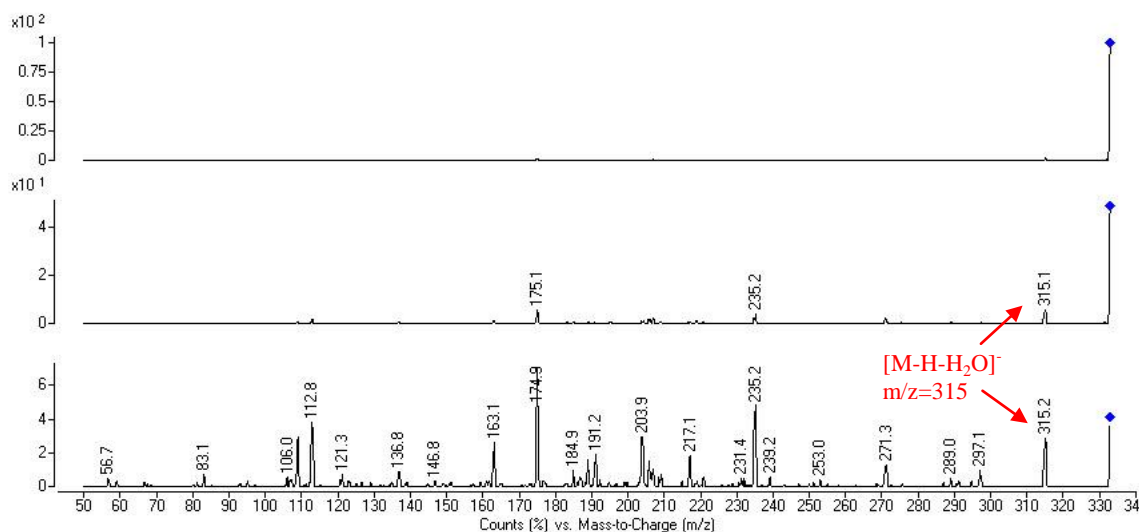
su samo  $[M-H]^-$  joni) uz napone 60, 80, 100, 120 i 150 V, i određene su površine pikova PGB<sub>2</sub>, 12-HETE i 12-HHT. Zavisnost površine (A) od napona prikazana je na *Slici 4.13*.



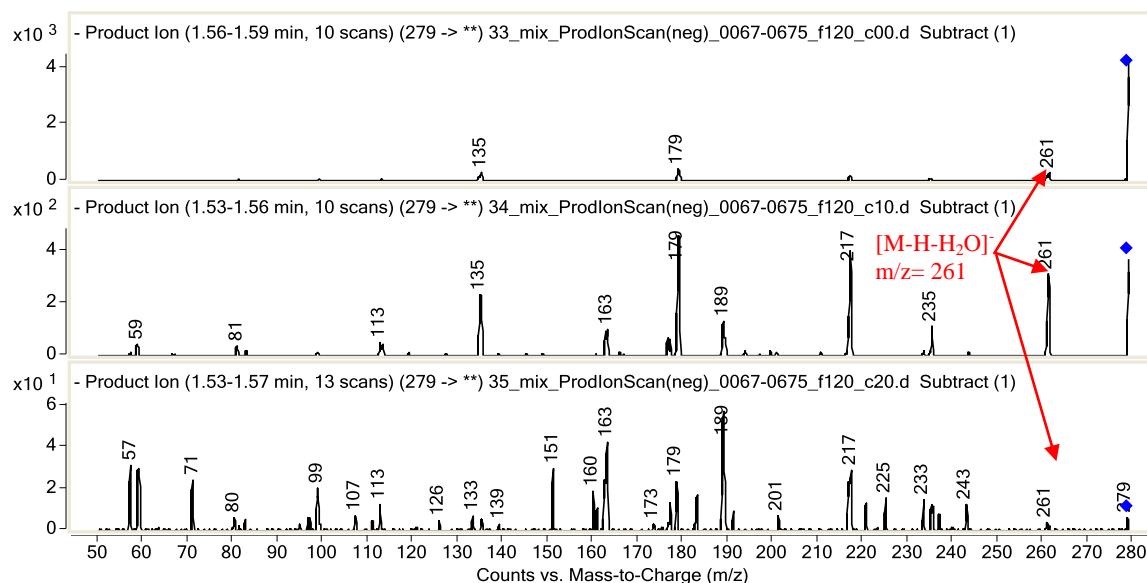
*Slika 4.13.* Optimizacija napona fragmentora

Kao optimalna vrednost odabran je napon od 120 V.

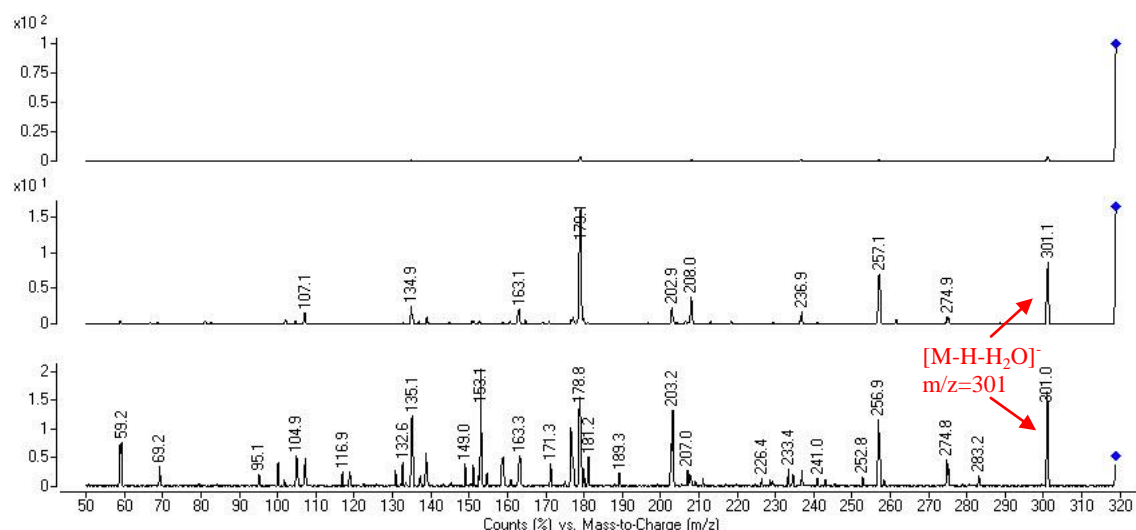
*Izbor fragmenata* obuhvatao je snimanje miksa standarda u Product Ion Scan modu, koji podrazumeva izolaciju željenog prekursora na Q1, kolizijom indukovanu disocijaciju u Q2 i skeniranje nastalih fragmenata na Q3. Korišćene su kolizionije energije 0, 10 i 20 V. Dobijeni spektri prikazani su na *Slikama 4.14.-4.16*.



*Slika 4.14.* CID spektri  $[M-H]^-$  jona PGB<sub>2</sub> pri kolizionim energijama 0, 10 i 20 V



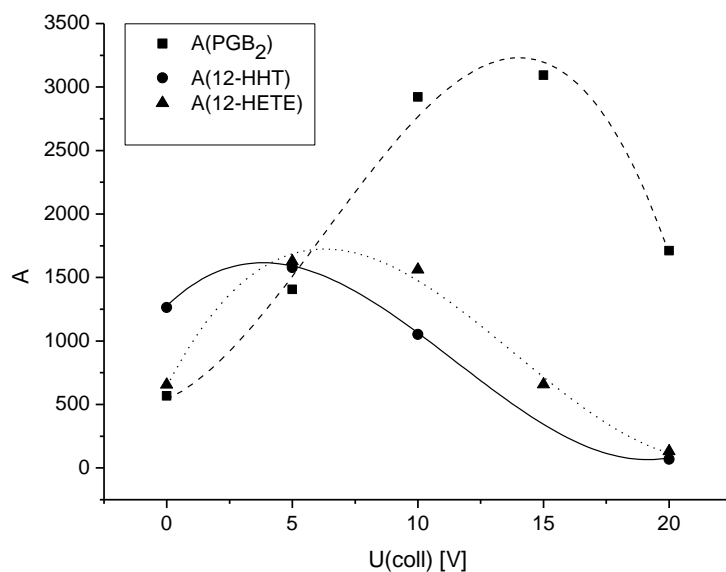
Slika 4.15. CID spektri  $[M-H]^-$  jona 12-HHT pri kolizionim energijama 0, 10 i 20 V



Slika 4.16. CID spektri  $[M-H]^-$  jona 12-HETE pri kolizionim energijama 0, 10 i 20 V

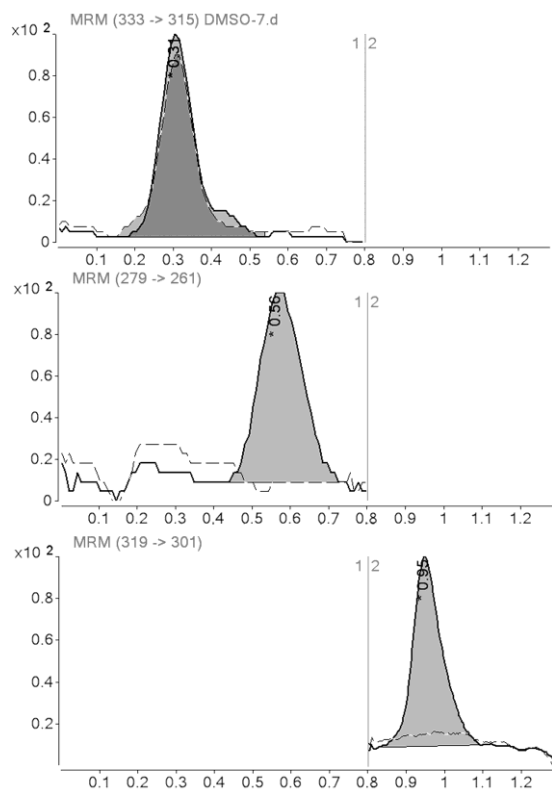
Iz spektara se vidi da molekuli PGB<sub>2</sub>, 12-HHT i 12-HETE i podležu intenzivnoj disocijaciji koja rezultuje velikim brojem fragmenata. Kod sva tri jedinjenja uočeni su intenzivni signali  $[M-H-H_2O]^-$ , koji su odabrani kao joni za kvantitaciju (target joni).

*Optimizacija kolizijom indukovane disocijacije (collision induced dissociation, CID)* obuhvatala je definisanje napona kolizione ćelije koji obezbeđuje maksimalan prinos target jona. Miks standarda analiziran je u MRM modu, pri čemu je napon variran u opsegu 0-20 V u inkrementima od 5 V. Optimalan napon (13 V za PGB<sub>2</sub>, 5 V za 12-HHT i 7 V za 12-HETE) je određen grafički, kao vrednost koja daje najveći odziv (površinu pika, A) - Slika 4.17.



Slika 4.17. Optimizacija napona kolizije ćelije

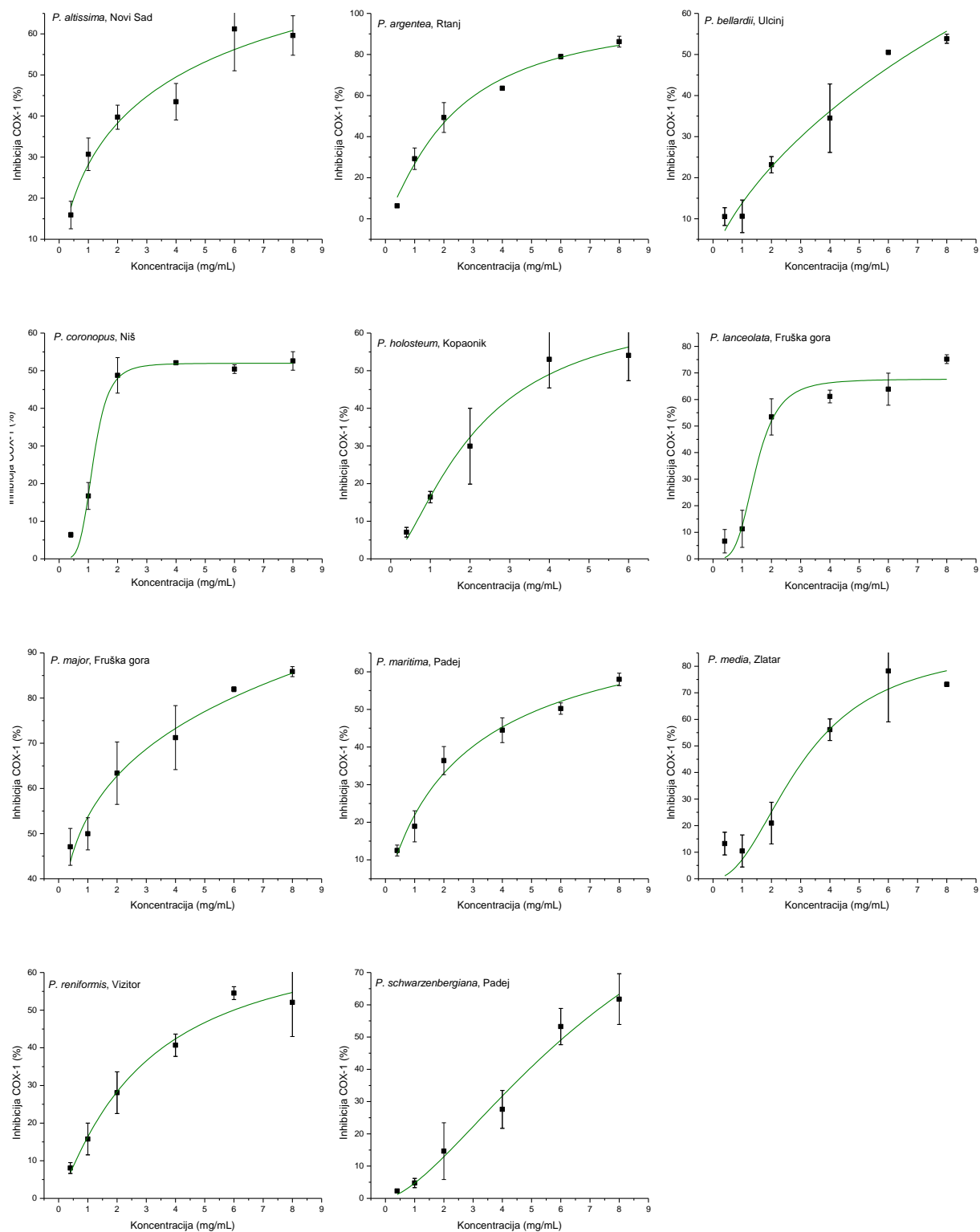
Tipičan hromatogram radne probe (puna linija) i korekcije (isprekidana linija), koja sadrži oba metabolita (12-HHT i 12-HETE) i interni standard PGB<sub>2</sub>, predstavljen je na Slici 4.18.



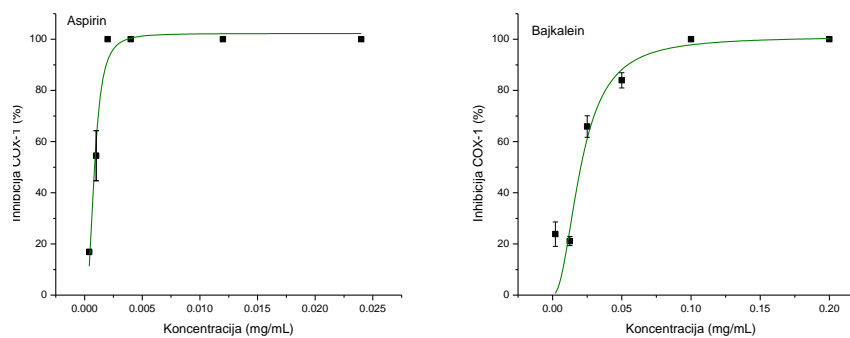
Slika 4.18. Hromatogram radne probe sa ekstraktom koncentracije 25 mg/ml (puna linija) i odgovarajuće korekcije (isprekidana linija); retenciono vreme: 0.31 min PGB<sub>2</sub>, 0.56 min 12-HHT, 0.95 min 12-HETE

Kao poslednji korak evaluacije performansi metode, određeno je nekoliko parametara. Standardne kalibracione krive (*standard calibration curves*, SC) u metanolu i kalibracione krive matriksa (*matrix-matched calibration curve*, MMC) u kojima je neaktiviranim trombocitima (matriks) dodat rastvor standarda, urađene su u rasponu koncentracija 50-1000 ng/mL (12-HHT) i 67-1333 ng/mL (12-HETE). Linearna regresija bez težinskih koeficijenata je odabrana za sve  $A/A_{\text{intst}} = f(C_{\text{anal}})$  krive, jer obezbeđuje najbolju distribuciju grešaka na krivi reziduala. Regresione jednačine i korelacioni faktori bili su sledeći: za 12-HHT/SC  $y = 0.00227x - 0.0189$  ( $r^2 = 0.994$ ), za 12-HHT/MMC  $y = 0.00213x - 0.03742$  ( $r^2 = 0.998$ ), za 12-HETE/SC  $y = 0.00414x - 0.1235$  ( $r^2 = 0.987$ ), za 12-HETE/MMC  $y = 0.00429x - 0.1648$  ( $r^2 = 0.994$ ). Uticaj matriksa izračunat je kao odnos smanjenje/povećanje signala (*signal suppression/enhancement*, SSE), odnosno odnos nagiba MMC i SC i iznosio je 94% za 12-HHT i 104% za 12-HETE. Za svaku MMC vrednost izračunat je odnos signal/šum (*signal-to-noise*, S/N), gde je signal definisan kao površina pika, a zatim je konstruisana kriva zavisnosti ovog odnosa od koncentracije standarda. Limit kvantitacije (*limit of quantitation*, LoQ) je određen kao koncentracija čiji rezultujući pik ima S/N odnos 10, što je iznosilo 0.10 µg/mL za 12-HHT i 0.15 µg/mL za 12-HETE, odnosno 0.5 i 0.75 ng standarda injektovanih na kolonu. Ove vrednosti odgovaraju koncentracijama eikozanoida u probama gde su postignute visoke inhibicije COX-1 ili 12-LOX ( $I > 80-85\%$ ) i ne ometaju određivanje  $IC_{50}$  vrednosti. Preciznost metode izračunata je kao srednja vrednost varijanse  $IC_{50}$  vrednosti dobijenih pri analizi aktivnosti jedanaest ekstrakata bokvica (za svaki uzorak konstruisane su tri krive sa šest tačaka i određene su  $IC_{50}$  vrednosti) i iznosi 9.3% za 12-HETE i 8.6% za 12-HHT.

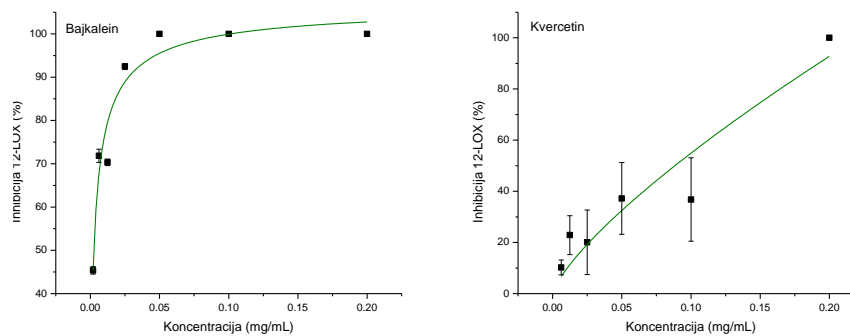
Optimizovani eksperimentalni postupak primenjen je za ispitivanje antiinflamatornog potencijala jedanaest vrsta roda *Plantago* i standardnih inhibitora aspirina (acetilsalicilna kiselina), kvercetina i bajkaleina. Step en inhibicije određen je na osnovu odnosa površine pikova metabolita i internog standarda, a rezultati su prikazani u Poglavlju 8.3. (Tabele 8.59.-8.83.). Svi ekstrakti i standardi su pokazali koncentraciono-zavisni step en inhibicije, a odgovarajući grafici, prikazani su na Slikama 4.19.-4.22.



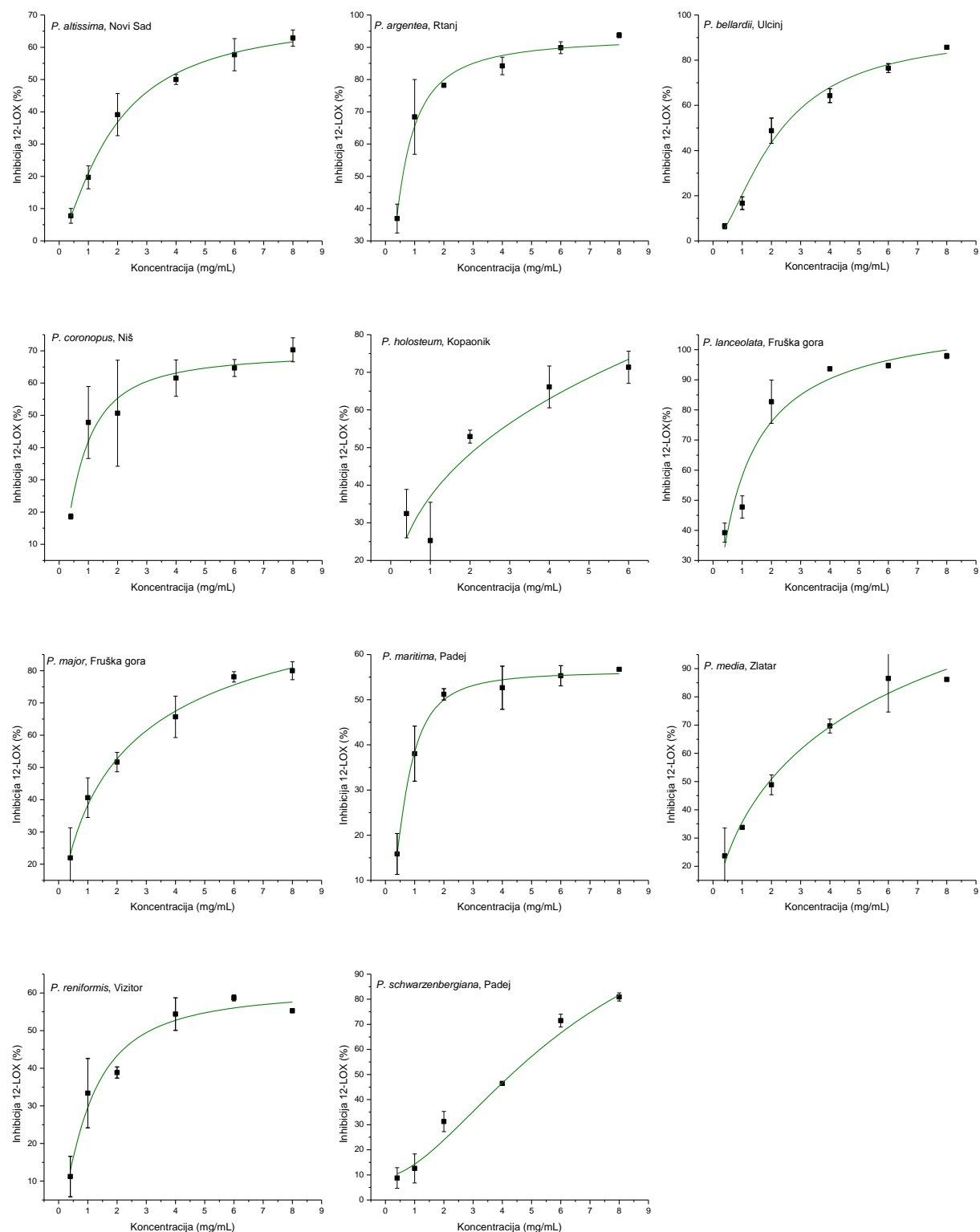
Slika 4.19. Grafici zavisnosti  
inhibicija COX-1 (%) - radna koncentracija ekstrakata (mg/mL)



Slika 4.20. Grafici zavisnosti  
inhibicija COX-1 (%) - radna koncentracija standardnih jedinjenja (mg/mL)

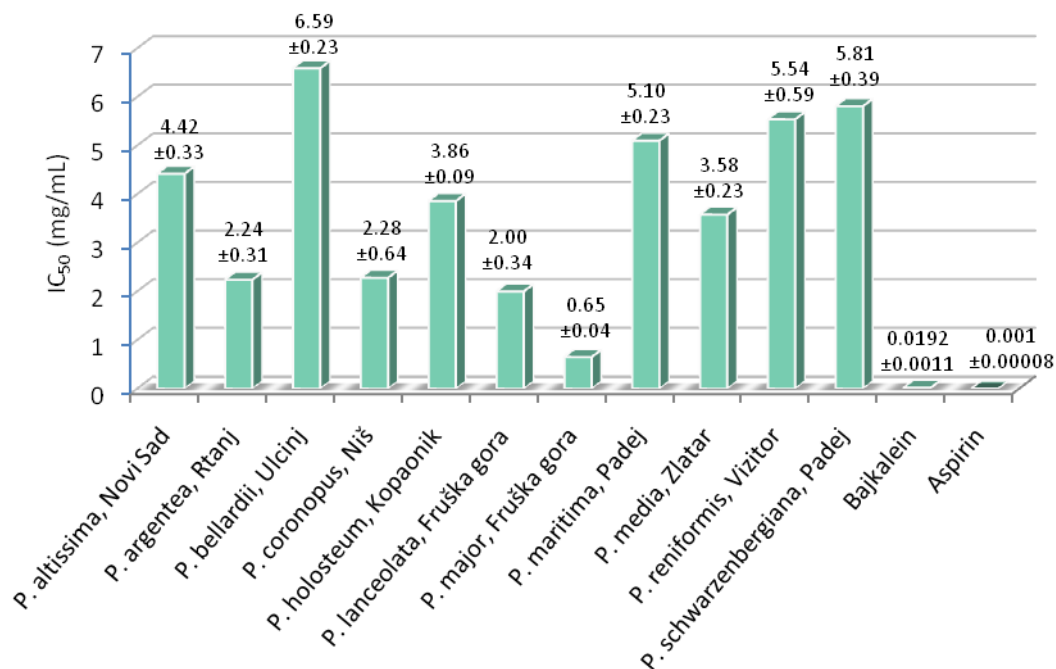


Slika 4.21. Grafici zavisnosti  
inhibicija 12-LOX (%) - radna koncentracija standardnih jedinjenja (mg/mL)



Slika 4.22. Grafici zavisnosti  
inhibicija 12-LOX (%) - radna koncentracija ekstrakata (mg/mL)

IC<sub>50</sub> vrednosti inhibicije COX-1 ispitani ekstrakata i standardnih inhibitora prikazane su na *Histogramu 4.16*.



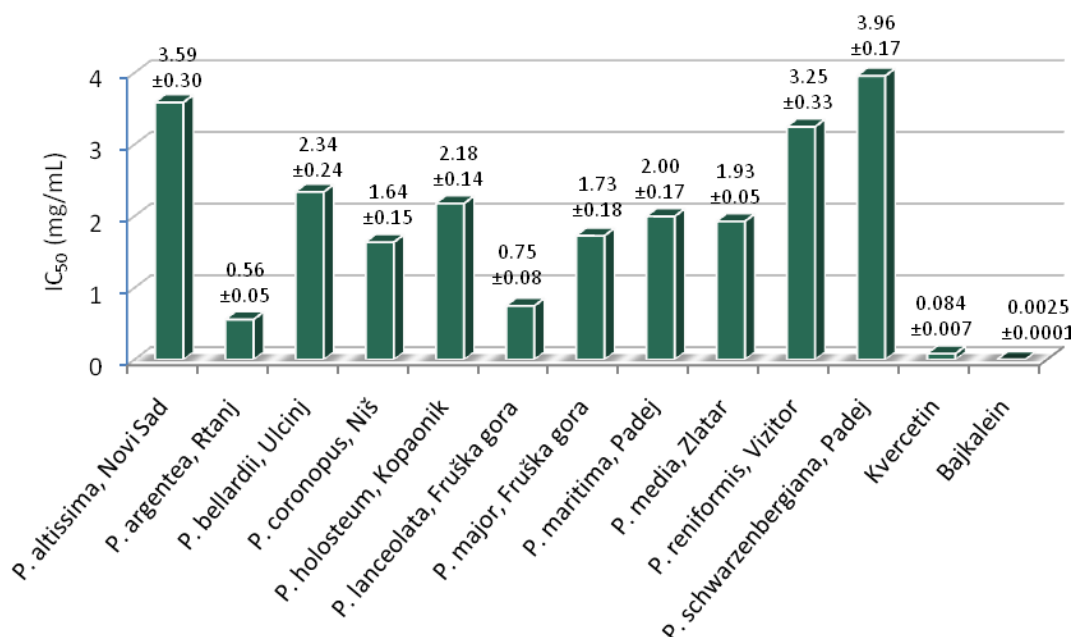
*Histogram 4.16. Potencijal COX-1 inhibicije*

Svi ispitani ekstrakti vrsta roda *Plantago* inhibirali su COX-1 postizući IC<sub>50</sub> vrednosti od 0.65 (*P. major*, Fruška gora) do 6.59 mg/mL (*P. bellardii*, Ulcinj). Ove vrednosti bile su veće od IC<sub>50</sub> vrednosti potentnog inhibitora aspirina (IC<sub>50</sub> = 0.001 mg/mL) i bajkaleina (IC<sub>50</sub> = 0.0192 mg/mL), dok kvercetin u ispitanoj koncentraciji (6.24-200 µg/mL) nije pokazao inhibitornu aktivnost, što je u skladu sa literaturnim podacima (You i sar., 1999). Iako postoje navodi o povećanoj ekspresiji COX-1 u ćelijama epitelnog kancera ovarijuma (Daikoku i sar., 2005), dojki (Hong i sar., 1999; McFadden i sar., 2006), kolona, pluća i prostate (Hong i sar., 1999) i da selektivni inhibitori ovog enzima mogu uticati na smanjenje rasta i proliferacije, kao i na apoptozu ćelija tumora (Daikoku i sar., 2005), smatra se da je COX-1 zapravo protektivni enzim. Kao što je već navedeno u *Poglavlju 2.3.2.*, COX-1 se nalazi u većini ćelija kao konstitutivni enzim i produkuje prostanoide koji su uključeni u normalnu homeostazu ćelije, kao na primer regulaciju vaskularnog odgovora i agregaciju trombocita. U bubrezima, prostaglandini nastali dejstvom COX-1 na arahidonsku kiselinu imaju ulogu vazodilatatora koji kontrolišu renalni protok plazme i glomerularnu filtraciju, dok u želudcu oni utiču na protok krvi u mikrocirkulaciji gastrične mukoze, štiteći ga na taj



način od ishemije, mukozalnog oštećenja i ulceritisa. U skladu sa navedenim, COX-1 inhibitorna aktivnost ispitanih ekstrakata može ukazivati na antikancerogeni potencijal ovih vrsta, a daljim ispitivanjima koja bi obuhvatala i sposobnost COX-2 inhibicije mogao bi se u potpunosti okarakterisati i antiinflamatorni potencijal. Naime, COX-2 ima vrlo značajnu ulogu u procesima inflamacije, indukciji bola i povišene temperature, a određivanje COX-1/COX-2 selektivnosti je zapravo krajnji cilj sveobuhvatnih ispitivanja sposobnosti inhibicije ciklooksigenaze. COX-2 aktivnost se može ispitati primenom različitih testova i eksperimentalnih uslova, u kojima COX-2 može biti humanog ili životinjskog porekla, nativna ili rekombinantna, prečišćena, u mikrozomima ili u različitim tipovima ćelija, kao što su makrofage, monociti, hondrociti, sinoviociti ili u ćelijskim linijama (ćelijska linija osteosarkoma 143.98.2, humana endotelna ćelijska linija HUV-EC-C). Takođe, razlikuju se i indukcionni agensi (lipopolisaharidi bakterija, citokini IL-1 ili TNF i dr.), kao i metode za detekciju metabolita egzogene ili endogene arahidonske kiseline (Pairet i van Ryn, 1998). Uobičajeno, COX-1 i COX-2 aktivnost se ispituje u različitim ćelijskim sistemima, iako se u krvi (*whole blood assay*) i monocitima nalaze oba izoenzima (Demasi i sar., 2000). Naravno, konačna antiinflamatorna aktivnost može biti određena u *in vivo* testovima, ali podaci dobijeni *in vitro*, u testovima gde su primenjeni fiziološki uslovi slični *in vivo* sistemima, mogu biti značajan pokazatelj inhibitornog potencijala ispitanih jedinjenja.

Pored toga što lipooksigenze učestvuju u procesu metabolizma arahidonske kieline, koji vodi ka biosintezi produkata odgovornih za nastajanje mnogih alergijskih reakcija, autoimunih oboljenja i inflamacija (*Poglavlje 2.3.3.*), neke od njih, kao na primer 12-LOX mogu uticati i na razvoj kancerogenih oboljenja. Smatra se da 12-LOX ima veliku ulogu u proliferaciji tumorskih ćelija, kao i u njihovom daljem rastu, jer je zabeležena mnogo veća koncentracija 12-LOX u malignim nego u benignim ćelijama tumora prostate, pankreasa, dojki i pluća (Nie i Horn, 2002), zbog čega je danas pronalaženje što potentnijih inhibitora 12-LOX veoma aktuelno (Ding i sar., 2003). IC<sub>50</sub> vrednosti 12-LOX inhibicije ispitani ekstrakata i standardnih inhibitora prikazane su na *Histogramu 4.17.*



Histogram 4.17. Potencijal 12-LOX inhibicije

Svi ekstrakti pokazali 12-LOX inhibitornu aktivnost dostižući IC<sub>50</sub> vrednosti u rasponu koncentracija od 0.56 (*P. argentea*, Rtanj) do 3.96 mg/mL (*P. schwarzenbergiana*, Padej), ali je ona bila niža od aktivnosti standardnih inhibitora kvercetina (IC<sub>50</sub> = 0.084 mg/mL) i bajkaleina (IC<sub>50</sub> = 0.0025 mg/mL). Budući da o 12-LOX inhibitornoj aktivnosti bokvica nema literaturnih podataka, ovi rezultati su značajan doprinos karakterizaciji biološke aktivnosti ispitanih vrsta.

Uzimajući u obzir dobijene rezultate, primenom regresione analize su izračunati korelacioni faktori između ukupnog sadržaja fenola, odnosno flavonoida i sposobnosti COX-1 i 12-LOX inhibicije, izražene kao recipročne vrednosti izračunatih IC<sub>50</sub> (Tabela 4.3.).

Tabela 4.3. Korelacioni faktor ( $R^2$ ) između ukupnog sadržaja fenola i flavonoida i COX-1 i 12-LOX inhibicije

	Korelacioni faktor ( $R^2$ )	
	Inhibicija COX-1	Inhibicija 12-LOX
Ukupni fenoli	0.4432	0.2934
Ukupni flavonoidi	0.6120	0.4534

Niski faktori korelacije između ukupnog sadržaja fenola i flavonoida i COX-1 i 12-LOX inhibicije ukazuju da ispitani ekstrakti sadrže i druge klase jedinjenja, kao što su na primer iridoidi i alkaloidi, koje mogu da doprinesu ovoj aktivnosti.

Uopšteno, *in vitro* metoda za određivanje aktivnosti humane, trombocitne COX-1 i 12-LOX primenjena je za ispitivanje inhibitornog potencijala metanolnih ekstrakata vrsta roda *Plantago*, kao i standardnih jedinjenja aspirina, kvercetina i bajkaleina. Eksperimentalni uslovi (odnos broja trombocita i aktivatora kalcimicina, faza izolovanja metabolita) su optimizovani kako za ispitivanje ekstrakata, tako i standardnih jedinjenja, a pored optimizacije, urađena je i validacija metode za detekciju nastalih metabolita (LC-MS/MS). Ispitane vrste bokvica pokazale su zadovoljavajući stepen COX-1 i 12-LOX inhibicije. Budući da o COX-1 inhibitornoj aktivnosti postoje literaturni podaci samo za dve, od ispitanih jedanaest, a da o sposobnosti 12-LOX inhibicije nema navoda ni za jednu vrstu, ovi rezultati pružaju značajne podatke za opštu karakterizaciju biološke aktivnosti i lekovitih potencijala vrsta roda *Plantago*.

U pogledu antiinflamatorne aktivnosti, odnosno potencijala inhibicije COX-1 i 12-LOX, ukupna aktivnost je opadala u sledećem nizu: *P. major*, Fruška gora > *P. argentea*, Rtanj > *P. lanceolata*, Fruška gora > *P. coronopus*, Niš > *P. media*, Zlatar > *P. holostium*, Kopaonik > *P. maritima*, Padej > *P. bellardii*, Ulcinj > *P. altissima*, Novi Sad > *P. reniformis*, Vizitor > *P. schwarzenbergiana*, Padej. Budući da su ekstrakti pokazali relativno male razlike u aktivnosti i imajući u vidu upotrebu *P. major*, *P. lanceolata* i *P. media* u tradicionalnoj i oficijelnoj medicini, ovi rezultati pokazuju da i ostale vrste takođe mogu biti dobri antiinflamatorni agensi.

Na osnovu rezultata ispitivanja ukupne biološke aktivnosti ekstrakata samoniklih bokvica, a u svetlu njihovih antioksidantnih i antiinflamatornih potencijala, može se zaključiti da aktivnost ekstrakata opada u nizu *P. lanceolata* > *P. argentea* > *P. major* > *P. holostium* > *P. maritima* > *P. bellardii* > *P. media* > *P. coronopus* > *P. reniformis* > *P. schwarzenbergiana* > *P. altissima*. Ovi podaci nedvosmisleno valorizuju upotrebu *P. lanceolata*, *P. major* i *P. media* u tradicionalnoj i oficijelnoj medicini, ali takođe ukazuju i na znatnu biološku aktivnost ostalih vrsta, posebno *P. argentea* i *P. holostium* i njihovu potencijalnu primenu kao lekovitih agenasa i izvora biološki aktivnih jedinjenja.

## 5. ZAKLJUČAK

Ispitivanja metanolnih ekstrakata jedanaest vrsta roda *Plantago* (*P. altissima* L., lokalitet Novi Sad; *P. argentea* Chaix, Rtanj; *P. bellardii* All., Ulcinj; *P. coronopus* L., Čanj i Niš; *P. holosteam* Scop., Dimitrovgrad i Kopaonik; *P. lanceolata* L., Bar, Fruška gora, Kopaonik i Zlatar; *P. major* L., Fruška gora, Kopaonik, Novi Sad i Zlatar; *P. maritima* L., Padej; *P. media* L., Kopaonik i Zlatar; *P. reniformis* Beck., Vizitor i *P. schwarzenbergiana* Schur., Padej) prikazanih u ovom radu obuhvatala su dva osnovna pravca: fitohemijski skrining u cilju određivanja kvantitativnog sastava odabranih sekundarnih biomolekula (iridoida aukubina, značajnog hemotaksonomskog markera vrsta ovog roda i šest flavonoida: luteolin-7-*O*-glukozida, apigenin-7-*O*-glukozida, rutina, apigenina, luteolina i kvercetina) i biohemijski skrining antioksidantnog i antiinflamatornog potencijala.

Kvantifikacija aukubina, luteolin-7-*O*-glukozida, apigenin-7-*O*-glukozida, rutina, apigenina, luteolina i kvercetina urađena je primenom visoko selektivne i specifične LC-MS/MS tehnike, koja omogućava detekciju vrlo niskih koncentracija ciljanog analita. Dobijeni su sledeći rezultati:

- Aukubin: od 10.38 do 63.05 mg/g s.e. za *P. holosteam*, Dimitrovgrad > *P. media*, Kopaonik > *P. lanceolata*, Zlatar > *P. lanceolata*, Fruška gora > *P. lanceolata*, Kopaonik > *P. media*, Zlatar > *P. schwarzenbergiana*, Padej > *P. lanceolata*, Bar > *P. maritima*, Padej > *P. altissima*, Novi Sad > *P. major*, Zlatar > *P. holosteam*, Kopaonik > *P. major*, Kopaonik > *P. argentea*, Rtanj, dok je količina manja od 5 mg/g s.e. detektovana u ekstraktima *P. bellardii*, Ulcinj, *P. coronopus*, Čanj, *P. coronopus*, Niš, *P. major*, Fruška gora, *P. major*, Novi Sad i *P. reniformis*, Vizitor.
- Luteolin-7-*O*-glukozid: od 1.33 do 213.58 µg/g s.e. za *P. lanceolata*, Zlatar > *P. major*, Kopaonik > *P. coronopus*, Niš > *P. altissima*, Novi Sad > *P. lanceolata*, Kopaonik > *P. maritima*, Padej > *P. coronopus*, Čanj > *P. lanceolata*, Fruška gora > *P. schwarzenbergiana*, Padej > *P. lanceolata*, Bar > *P. reniformis*, Vizitor, dok u ekstraktima vrsta *P. bellardii* (Ulcinj) i *P. media* (oba lokaliteta-Kopaonik i Zlatar) nije detektovan ovaj flavonoid
- Apigenin-7-*O*-glukozid: od 0.55 do 117.77 µg/g s.e. za *P. argentea*, Rtanj > *P. schwarzenbergiana*, Padej > *P. holosteam*, Kopaonik > *P. holosteam*,

Dimitrovgrad > *P. major*, Fruška gora > *P. media*, Zlatar > *P. major*, Zlatar > *P. major*, Kopaonik > *P. media*, Kopaonik > *P. lanceolata*, Zlatar > *P. coronopus*, Niš > *P. major*, Novi Sad > *P. coronopus*, Čanj > *P. reniformis*, Vizitor > *P. lanceolata*, Kopaonik > *P. lanceolata*, Bar > *P. maritima*, Padej > *P. lanceolata*, Fruška gora, dok u ekstraktima vrsta *P. altissima* (Novi Sad) i *P. bellardii* (Ulcinj) nije detektovano ovo jedinjenje

- Luteolin: od 3.89 do 121.08 µg/g s.e. za *P. argentea*, Rtanj > *P. maritima*, Padej > *P. holostium*, Kopaonik > *P. lanceolata*, Zlatar > *P. holostium*, Dimitrovgrad > *P. lanceolata*, Kopaonik; manje od 2.5 µg/g s.e. za *P. coronopus* (Čanj i Niš), *P. lanceolata* (Bar i Fruška gora) i *P. schwarzenbergiana* (Padej), dok ekstrakti vrsta *P. altissima* (Novi Sad), *P. bellardii* (Ulcinj), *P. major* (svi lokaliteti), *P. media* (oba lokaliteta) i *P. reniformis* (Vizitor) nisu sadržali ovo jedinjenje
- Apigenin: 25.99 µg/g s.e. za *P. argentea* (Padej), manje od 2.5 µg/g s.e. za *P. holostium* (Dimitrovgrad), *P. media* (oba lokaliteta) i *P. schwarzenbergiana* (Padej) dok u ostalim ekstraktima nije detektovan
- Rutin: od 0.18 do 444.53 µg/g s.e. za *P. bellardii*, Ulcinj >> *P. lanceolata*, Kopaonik > *P. argentea*, Rtanj > *P. lanceolata*, Bar > *P. major*, Fruška gora > *P. reniformis*, Vizitor > *P. media*, Zlatar > *P. lanceolata*, Zlatar > *P. coronopus*, Čanj > *P. lanceolata*, Fruška gora > *P. major*, Kopaonik > *P. major*, Zlatar i manje od 0.05 µg/g s.e. za *P. altissima*, *P. coronopus* (Niš), *P. holostium* (oba lokaliteta), *P. major* (Novi Sad), *P. maritima* (Padej), *P. media* (Kopaonik) i *P. schwarzenbergiana* (Padej)
- Kvercetin: manje od 2.5 µg/g s.e. za *P. coronopus* (Čanj), *P. lanceolata* (Fruška gora), *P. major* (Fruška gora) i *P. reniformis* (Vizitor), dok u ostalim ekstraktima nije detektovan

U kvantitativnom smislu, sadržaj flavonoida koji je određen u ispitanim ekstraktima može ukazati na potencijalnu biološku aktivnost date vrste, uzimajući u obzir primenjenu koncentraciju aktivne komponente u biohemijским testovima. Ekstrakti u kojima je utvrđeno prisustvo luteolin-7-*O*-glukozida i luteolina sadrže ova jedinjenja u količinama koje su, po literaturnim navodima, dovoljne da se postigne inhibicija rasta određenih ćelijskih linija, pa se može pretpostaviti da ispitane vrste poseduju antikancerogenu aktivost. Slično tome, upotreba ovi ekstrakata kao antispazmotskih

agenasa može biti implicirana sadržajem luteolina koji je dovoljan za ispoljavanje ovog efekta.

U kvalitativnom smislu, dobijeni rezultati za vrste čiji flavonoidni sastav do sada nije bio ispitan (*P. altissima*, *P. argentea*, *P. coronopus*, *P. holostium*, *P. maritima*, *P. media*, *P. reniformis* i *P. schwarzenbergiana*), kao i rezultati koji su u saglasnosti sa ranijim ispitivanjima *P. bellardii*, *P. major*, *P. lanceolata*, ukazuju na to da ove vrste mogu biti svrstane u flavonski (flavon glikozidni) hemotip, jer su luteolin-7-*O*-glukozid, apigenin-7-*O*-glukozid i odgovarajući aglikoni dominantno zastupljeni, dok su flavonoli kvercetin i rutin detektovani samo u pojedinim vrstama i u vrlo malim količinama. Takođe, ovi rezultati predstavljaju značajan doprinos fitohemijskoj karakterizaciji do sada neispitanih vrsta.

Antioksidantna aktivnost ispitanih ekstrakata određena je primenom odgovarajućih testova i upoređena sa aktivnošću sintetičkih antioksidanasa BHA (butilovani hidroksianizol) i BHT (butilovani hidroksitoluen). Dobijeni su sledeći rezultati:

- Sposobnost neutralizacije DPPH<sup>•</sup> radikala: IC<sub>50</sub> vrednosti od 4.20 do 12.35 µg/mL; aktivnost *P. lanceolata*, Fruška gora > *P. coronopus*, Čanj > *P. major*, Fruška gora > *P. media*, Kopaonik > *P. media*, Zlatar > *P. holostium*, Dimitrovgrad > *P. coronopus*, Niš > *P. maritima*, Padej > *P. lanceolata*, Zlatar > *P. holostium*, Kopaonik > *P. argentea*, Rtanj > *P. major*, Kopaonik > *P. lanceolata*, Kopaonik > BHT > *P. bellardii*, Ulcinj > *P. major*, Novi Sad > *P. lanceolata*, Bar > *P. schwarzenbergiana*, Padej > *P. altissima*, Novi Sad > *P. reniformis*, Vizitor > *P. major*, Zlatar > BHA
- Kapacitet „hvatanja“ HO<sup>•</sup> radikala: IC<sub>50</sub> vrednosti od 120.47 do 338.60 µg/mL; aktivnost *P. argentea*, Rtanj > *P. lanceolata*, Zlatar > *P. holostium*, Kopaonik > *P. coronopus*, Niš > *P. major*, Zlatar > *P. holostium*, Dimitrovgrad > *P. schwarzenbergiana*, Padej > *P. maritima*, Padej > *P. major*, Kopaonik > *P. lanceolata*, Kopaonik > BHT > *P. media*, Zlatar > *P. bellardii*, Ulcinj > *P. lanceolata*, Fruška gora > *P. major*, Novi Sad > *P. reniformis*, Vizitor > *P. media*, Kopaonik > *P. lanceolata*, Bar > *P. altissima*, Novi Sad > BHA > *P. coronopus*, Čanj > *P. major*, Fruška gora
- Kapacitet „hvatanja“ O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radikala: IC<sub>50</sub> vrednosti od 17.40 do 76.66 µg/mL; aktivnost *P. bellardii*, Ulcinj > *P. lanceolata*, Fruška gora > *P. major*, Fruška gora

- > *P. altissima*, Novi Sad > *P. media*, Zlatar > *P. reniformis*, Vizitor > *P. maritima*, Padej > *P. coronopus*, Čanj > *P. major*, Zlatar > *P. major*, Novi Sad > *P. major*, Kopaonik > *P. argentea*, Rtanj > *P. schwarzenbergiana*, Padej > *P. media*, Kopaonik > *P. holostium*, Dimitrovgrad > *P. lanceolata*, Zlatar > *P. holostium*, Kopaonik > *P. lanceolata*, Kopaonik > *P. lanceolata*, Bar > *P. coronopus*, Niš, dok BHA i BHT nisu pokazali koncentraciono zavisnu aktivnost
- Kapacitet „hvatanja“ NO<sup>•</sup> radikala: IC<sub>50</sub> vrednost od 0.19 do 2.16 mg/mL; aktivnost *P. lanceolata*, Fruška gora > *P. reniformis*, Vizitor > *P. bellardii*, Ulcinj > *P. coronopus*, Čanj > *P. maritima*, Padej > *P. argentea*, Rtanj > *P. major*, Fruška gora > *P. holostium*, Kopaonik > *P. holostium*, Dimitrovgrad > *P. coronopus*, Niš > *P. lanceolata*, Zlatar > *P. altissima*, Novi Sad > *P. major*, Novi Sad > *P. lanceolata*, Bar > *P. media*, Kopaonik > *P. media*, Zlatar > *P. lanceolata*, Kopaonik > *P. schwarzenbergiana*, Padej > *P. major*, Kopaonik > *P. major*, Zlatar, dok BHA i BHT nisu pokazali koncentraciono zavisnu aktivnost
  - Inhibicija lipidne peroksidacije: IC<sub>50</sub> vrednost od 11.38 do 177.71 µg/mL; aktivnost *P. argentea*, Rtanj > *P. lanceolata*, Kopaonik > *P. holostium*, Dimitrovgrad > *P. lanceolata*, Bar > *P. lanceolata*, Zlatar > BHA > *P. holostium*, Kopaonik > BHT > *P. lanceolata*, Fruška gora > *P. major*, Fruška gora > *P. major*, Zlatar > *P. media*, Kopaonik > *P. schwarzenbergiana*, Padej > *P. bellardii*, Ulcinj > *P. major*, Kopaonik > *P. major*, Novi Sad > *P. media*, Zlatar > *P. reniformis*, Vizitor > *P. maritima*, Padej > *P. coronopus*, Čanj > *P. coronopus*, Niš > *P. altissima*, Novi Sad
  - Redukcioni potencijal: od 25.32 do 120.02 mg ekviv. askorbinske kiseline/g s.e.; aktivnost *P. media*, Kopaonik > *P. media*, Zlatar > *P. holostium*, Kopaonik > *P. lanceolata*, Fruška gora > *P. maritima*, Padej > *P. coronopus*, Čanj > *P. holostium*, Dimitrovgrad > *P. coronopus*, Niš > *P. lanceolata*, Zlatar > *P. lanceolata*, Kopaonik > *P. major*, Fruška gora > *P. major*, Kopaonik > *P. altissima*, Novi Sad > *P. lanceolata*, Bar > *P. schwarzenbergiana*, Padej > *P. argentea*, Rtanj > *P. major*, Zlatar > *P. bellardii*, Ulcinj > *P. major*, Novi Sad > *P. reniformis*, Vizitor > BHT.

U cilju određivanja korelacije između sadržaja ukupnih fenola i flavonoida, potentnih prirodnih antioksidanasa i antioksidantne aktivnosti ispitanih ekstrakata, sadržaj ovih jedinjenja je određen primenom spektrofotometrijske metode i iznosio je:

- Sadržaj ukupnih fenola: od 34.95 do 87.43 mg ekv. galne kiseline/g s.e. za *P. lanceolata*, Fruška gora > *P. altissima*, Novi Sad > *P. coronopus*, Niš > *P. media*, Zlatar > *P. media*, Kopaonik > *P. holostium*, Kopaonik > *P. maritima*, Padej > *P. holostium*, Dimitrovgrad > *P. lanceolata*, Kopaonik > *P. coronopus*, Čanj > *P. major*, Zlatar > *P. lanceolata*, Zlatar > *P. major*, Kopaonik > *P. major*, Fruška gora > *P. lanceolata*, Bar > *P. argentea*, Rtanj > *P. reniformis*, Vizitor > *P. bellardii*, Ulcinj > *P. schwarzenbergiana*, Padej > *P. major*, Novi Sad
- Sadržaj ukupnih flavonoida: od 4.08 do 18.48 mg ekv. kvercetina/g s.e. za *P. bellardii*, Ulcinj > *P. holostium*, Kopaonik > *P. maritima*, Padej > *P. holostium*, Dimitrovgrad > *P. media*, Zlatar > *P. media*, Kopaonik > *P. altissima*, Novi Sad > *P. coronopus*, Čanj > *P. coronopus*, Niš > *P. argentea*, Rtanj > *P. lanceolata*, Bar > *P. major*, Fruška gora > *P. lanceolata*, Zlatar > *P. lanceolata*, Fruška gora > *P. major*, Novi Sad > *P. lanceolata*, Kopaonik > *P. major*, Zlatar > *P. reniformis*, Vizitor > *P. major*, Kopaonik > *P. schwarzenbergiana*, Padej

Sve ispitane vrste roda *Plantago* su dobri antioksidantni agensi, odnosno mogu da utiču na sprečavanje slobodnoradikalskih procesa zasnovanih na transferu elektrona, neutralizaciji slobodnoradikalskih vrsta ili na inhibiciju lipidne peroksidacije. Takođe, utvrđen je izvestan stepen korelacije između sadržaja fenola, odnosno flavonoida u ispitanim ekstraktima i navedenih antioksidantnih aktivnosti. Dobijeni rezultati ukazuju da su ispitane vrste roda *Plantago* potencijalni izvor prirodnih proizvoda, koji mogu biti potentni antioksidantni agensi.

Za određivanje aktivnosti humane, trombocitne COX-1 i 12-LOX, enzima uključenih u metabolizam arahidonske kiseline, čiji su proizvodi značajni medijatori zapaljenskih procesa, primenjena je optimizovana *in vitro* metoda. Urađeno je ispitivanje inhibitornog potencijala metanolnih ekstrakata vrsta roda *Plantago*, kao i standardnih jedinjenja aspirina, kvercetina i bajkaleina. Eksperimentalni uslovi (odnos broja trombocita i aktivatora kalcimicina, faza izolovanja metabolita) su optimizovani kako za ispitivanje ekstrakata, tako i standardnih jedinjenja, a pored optimizacije, urađena je i



validacija metode za detekciju nastalih metabolita (LC-MS/MS). Dobijeni su sledeći rezultati:

- Inhibicija COX-1: IC<sub>50</sub> vrednosti od 0.001 do 6.59 mg/mL; aktivnost: aspirin > bajkalein > *P. major*, Fruška gora > *P. lanceolata*, Fruška gora > *P. argentea*, Rtanj > *P. coronopus*, Niš > *P. media*, Zlatar > *P. holostium*, Kopaonik > *P. altissima*, Novi Sad > *P. reniformis*, Vizitor > *P. schwarzenbergiana*, Padej > *P. bellardii*, Ulcinj
- Inhibicija 12-LOX: IC<sub>50</sub> vrednosti od 0.0025 do 3.96 mg/mL; aktivnost: bajkalein > kvercetin > *P. argentea*, Rtanj > *P. lanceolata*, Fruška gora > *P. coronopus*, Niš > *P. major*, Fruška gora > *P. media*, Zlatar > *P. maritima*, Padej > *P. holostium*, Kopaonik > *P. bellardii*, Ulcinj > *P. reniformis*, Vizitor > *P. altissima*, Novi Sad > *P. schwarzenbergiana*, Padej

Ekstrakti svih ispitanih vrsta bokvica pokazali su odgovarajuću aktivnost pri inhibiciji COX-1 i 12-LOX. Budući da za COX-1 inhibitornu aktivnosti postoje literaturni podaci samo za dve, od ispitanih jedanaest, a da o sposobnosti inhibicije 12-LOX nema navoda ni za jednu vrstu, ovi rezultati pružaju značajne podatke za opštu karakterizaciju biološke aktivnosti i lekovitih potencijala vrsta roda *Plantago*.

Ukupni antioksidantni i antiinflamatorni potencijal ispitanih vrsta bokvica opada u nizu *P. lanceolata* > *P. argentea* > *P. major* > *P. holostium* > *P. maritima* > *P. bellardii* > *P. media* > *P. coronopus* > *P. reniformis* > *P. schwarzenbergiana* > *P. altissima*. Pored nedvosmislene valorizacije upotrebe *P. lanceolata*, *P. major* i *P. media* u tradicionalnoj i oficijelnoj medicini, ovi rezultati ukazuju i na znatnu biološku aktivnost ostalih vrsta, posebno *P. argentea* i *P. holostium* i njihovu potencijalnu primenu kao lekovitih agenasa i izvora prirodnih, biološki aktivnih jedinjenja.

## 6. SUMMARY

The genus *Plantago* L. (Plantaginaceae) comprises about 275 species that can be found all over the world. The popularity of these plants for their wide application as herbal remedies has been known from ancient times, and it is due to their impressive variety of curative properties: astringent, styptic, antimicrobial, expectorant, diuretic, and demulcent (Tucakov, 1997; Jančić, 2002). Furthermore, several previous studies have indicated that certain *Plantago* species reveal considerable cytotoxic effect on cancer cell lines (Galvéz et al., 2003) and antiviral (Chiang et al., 2002), antiinflammatory (Guillén et al., 1997; Vigo et al., 2005; Turel et al., 2009), analgesic (Fleer and Versphol, 2007) and antispasmodic activities (Fleer and Versphol, 2007). Concerning the antioxidant activity of *Plantago* species, there are also some reports that witness this benefit (Galvéz et al., 2005a; Galvéz et al., 2005b; Heimler et al., 2007). Additionally, phytochemical studies have shown that the *Plantago* genus contains a great amount of natural products such as iridoids, flavonoids, tannins, triterpenes, saponins, and sterols (Kawashty et al., 1994; Samuelsen, 2000; Taskova et al., 2002;). On the other hand, some *Plantago* species are also included in the diet and are usually consumed as fresh salads (Tucakov, 1997; Jančić, 2002; Heimler et al., 2007). However, these studies are mostly focused on several renowned *Plantago* species, such as *P. major* and *P. lanceolata*, accepted as official remedies.

To characterize methanol extracts of eleven *Plantago* L. species (*P. altissima* L., *P. argentea* Chaix, *P. bellardii* All., *P. coronopus* L., *P. holosteum* Scop., *P. lanceolata* L., *P. major* L., *P. maritima* L., Padej; *P. media* L., *P. reniformis* Beck. and *P. schwarzenbergiana* Schur.) collected from several localities in Serbia and Montenegro, which composition and biological activity are generally unexamined, phytochemical screening and some tests of antioxidant and anti-inflammatory activity were undertaken. The content of several secondary metabolites (aucubin, luteolin-7-*O*-glucoside, apigenin-7-*O*-glucoside, luteolin, apigenin, rutin and quercetin) was determined by LC-MS/MS technique. LC-MS/MS analysis showed noticeable qualitative and quantitative differences between the species according to which the examined *Plantago* species could be regarded as a possible new source of natural products. Antioxidant activity of extracts (radical scavenger capacity, reduction potential and inhibition of lipid peroxidation) was examined by spectrophotometric methods. In all of the tests extracts showed a potent antioxidant

effect compared with well-known synthetic antioxidants. To evaluate anti-inflammatory activity of extracts, an optimized and validated *in vitro* test for determination of cyclooxygenase-1 (COX-1) and 12-lipoxygenase (12-LOX) inhibition potency was undertaken. By using intact cell system (platelets) as a source of COX-1 and 12-LOX enzymes and highly sensitive and specific LC–MS/MS technique for detection of main arachidonic acid metabolites formed by COX-1 and 12-LOX, this test provides efficient method for evaluation of anti-inflammatory potential of plant extracts and isolated compounds. Our results validated the well-known COX-1 inhibitory activity of *P. lanceolata* and *P. major* methanol extracts, as well as similar inhibitory potency of other species. Furthermore, 12-LOX inhibitory activity of all examined extracts was reported for the first time. Although renowned inhibitors, such as acetylsalicylic acid and quercetin showed higher activity, this study verifies examined *Plantago* species as considerable anti-inflammatory agents.

Considering antioxidant and anti-inflammatory potential, overall activity of extracts can be ranged as follows: *P. lanceolata* > *P. argentea* > *P. major* > *P. holostium* > *P. maritima* > *P. bellardii* > *P. media* > *P. coronopus* > *P. reniformis* > *P. schwarzenbergiana* > *P. altissima*. These results undoubtedly validate the use of *P. lanceolata*, *P. major* and *P. media* in traditional and official medicine, and also indicate significant biological activity of other examined species, particularly *P. argentea* and *P. holostium*, as well as their potential appliance as remedies and a source of natural products.

## 7. LITERATURA

- Abad, M.J., Bessa, A.L., Ballarin, B., Aragón, O., Gonzales, E., Bermejo, P. (2006): Anti-inflammatory activity of four Bolivian *Baccharis* species (Compositae). *J. Ethnopharmacol.* **103**: 338-344.
- Abbas, A.A., Lichtman, A.H. (2006): *Osnovna imunologija*. Data Status, Beograd, Srbija.
- Afifi, M.S.A., Amer, M.M.A., Zaghloul, A.M., Ahmad, M.M, Kinghorn, A.D., Zaghloul, M.G. (2001): Chemical constituents of *Plantago squarrosa*. *Mansoura J. Pharm. Sci.* **17**: 65-84.
- Ahmed, Z.H., Hammouda, F.M., Rizk, A.M., Wassel, G.M. (1968): Phytochemical studies of egyptian *Plantago* species. *Planta Med.* **4**: 404-410.
- Alanko, J., Kurahashi, Y., Yoshimoto, T., Yamamoto, S., Baba, K. (1994): Panaxynol, a polyacetylene compound isolated from Oriental medicines, inhibits mammalian lipooxygenases. *Biochem. Pharmacol.* **48**: 1979–1981.
- Al-Mamun, M., Yamaki, K., Masumizu, T., Nakai, Y., Saito, K., Sano, H., Tamura Y. (2007): Superoxide anion radical scavenging activities of herbs and pastures in northern Japan determined using electron spin resonance spectrometry. *Int. J. Biol. Sci.* **3**: 349-355.
- Ammon, H.P.T., Safayhi, H., Mack, T., Sabieraj, J. (1993): Mechanism of antiinflammatory actions of curcumine and boswellic acids. *J. Ethnopharmacol.* **38**: 113–119.
- Andary, C., Motte-Florac, M.E., Gargadenne, A., Wylde, R., Heitz, A. (1988): Les esters caféiques du genre *Plantago*. Identification et valeur chimotaxinomique. *Plant. Méd. Phytothér.* **22**: 17-22.
- Andrzejewska-Golec, E. (1997): Taxonomic aspects of the iridoid glucosides occurring in the genus *Plantago* L. *Acta Soc. Bot. Pol.* **66**: 201-205.
- Andrzejewska-Golec, E., Ofterdinger-Daegel, S., Calis, I., Swiatek, L. (1993): Chemotaxonomic aspects of iridoids occurring in *Plantago* subg. *Psyllium* (Plantaginaceae). *Plant Sys. Evol.* **185**: 85-89.
- Antón, R., Camacho, M., Puig, L., Vila, L. (2002): Hepoxilin B3 and its enzymatically formed derivative trioxilin B3 are incorporated into phospholipids in psoriatic lesions. *J. Invest. Dermatol.* **118**: 139-146.

- Barnes, P.J. (1998): Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin. Sci.* **94**: 557-572.
- Barnett, J., Chow, J., Ives, D., Chiou, M., Mackenzie, R., Osen, E., Nguyen, B., Tsing, S., Bach, C., Freire, J., Chan, H., Sigal, E., Ramesha, C. (1994): Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system. *Biochim. Biophys. Acta*, **1209**: 130-139.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996): The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**: 70-76.
- Bernstein, P.R. (1998): Chemistry and structure–activity relationships of leukotriene receptor antagonists. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **157**: 220-226.
- Bezakova, L., Kartnig, T., Psenak, M. (1996b): Effect of flavonoids of *Hypericum perforatum* L. on lipoxygenase activity. *Chemicke Listy*, **90**: 697–698.
- Bezakova, L., Masterova, I., Paulikova, I., Psenak, M. (1996a): Inhibitory activity of isorhamnetin glycosides from *Calendula officinalis* L. on the activity of lipoxygenase. *Pharmazie*, **51**: 126–127.
- Bigby, T.D. (2002): The Yin and the Yang of 5-Lipoxygenase Pathway Activation. *Mol. Pharmacol.* **62**: 200-202.
- Blanco, F., Guitian, R., Moreno, De Toro, F.J., Galdo, F. (1999): Effect of antiinflammatory drugs on COX-1 and COX-2 activity in human articular chondrocytes. *J. Rheumatol.* **26**: 1366-1373.
- Blewett, A.J., Varma, D., Gilles, T., Libonati, J.R., Jansen, S.A. (2008): Development and validation of a high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry method for the simultaneous determination of 23 eicosanoids. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **45**: 653-662.
- Bräutigam, M., Franz, G. (1985): Versuche zur Gewbekultur von schleimbildenden pflanzlichen Geweben. *Sci. Pharm.* **53**: 237-246.
- Brideau, C., Kargman, S., Liu, S., Dallob, A.L., Ehrich, E.W., Rodger, I.W., Chan, C.C. (1996): A human whole blood assay for clinical evaluation of biochemical efficacy of cyclooxygenase inhibitors. *Inflamm. Res.* **45**: 68–74.
- Cadenas, E., Davies, J.A.K. (2000): Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Rad. Biol. Med.* **29**: 222-230.

- Catella, F., Lawson, J.A., Fitzgerald D. J., Fitzgerald G.A. (1990): Endogenous biosynthesis of arachidonic acid epoxides in humans: increased formation in pregnancy-induced hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 5893–5897.
- Chan, C.C. (2003): In Vivo Assays for COX-2. U: Winyard, P.G., Willoughby, D.A. (ed.) *Methods in Molecular Biology*, vol. 225: *Inflammation Protocols*. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey. 321-328.
- Chang, C.C., Yang, H.M., Chern, J.C. (2002): Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food. Drug. Anal.* **10**: 178-182.
- Chang, I.M. (1997): Antiviral activity of aucubin against hepatitis B virus replication. *Phytother. Res.* **11**: 189-192.
- Charlier, C., Michaux, C. (2003): Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Eur. J. Med. Chem.* **38**: 645-659.
- Chen, W., Pawelek, T.R., Kulmacz, R.J. (1999): Hydroperoxide dependence and cooperative cyclooxygenase kinetics in prostaglandin H synthase-1 and -2. *J. Biol. Chem.* **274**: 20301–20306.
- Chi, Y.S., Jong, H.G., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S., Kim, H.P. (2001): Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochem. Pharmacol.* **62**: 1185–1191.
- Chiang, L.C., Chiang, W., Chang, M.Y., Ng, L.T., Lin, C.C. (2003a): Antileukemic activity of selected natural products in Taiwan. *Am. J. Chin. Med.* **31**: 37-46.
- Chiang, L.C., Ng, L.T., Chiang, W., Chang, M.Y., Lin, C.C. (2003b): Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species. *Planta Med.* **69**: 600-604.
- Choi, S.Y., Jung, S.H., Lee, H.S., Park, K.W., Yun, B.S., Lee, K.W. (2008a): Glycation inhibitory activity and the identification of an active compound in *Plantago asiatica* extract. *Phytother. Res.* **22**: 323 – 329.
- Choi, Y., Gu, J.B., Kim, M., Lee, J. (2008b): Antioxidant and antiproliferative activities of methanolic extracts from thirty Korean medicinal plants. *Food Sci. Biotechnol.* **17**: 1235-1239.

- Chon, S.U., Heo, B.G., Park, Y.S., Cho, J.Y., Gorinstein, S. (2008): Characteristics of the leaf parts of some traditional Korean salad plants used for food. *J. Sci. Food. Agric.* **88**: 1963-1968.
- Churchill, L., Graham, A.G., Shih, C.K., Pauletti, D., Farina, P.R., Grob, P.M. (1996): Selective inhibition of human cyclo-oxygenase-2 by meloxicam. *Inflammopharmacology*, **4**: 125-135.
- Çoban, T., Çitoğlu, G.S., Sever, B., Işcan, M. (2003): Antioxidant activities of plants used in traditional medicine in Turkey. *Pharm. Biol.* **41**: 608-613.
- Connor, J.R., Manning, P.T., Settle, S.L., Moore, W.M., Jerome, G.M., Webber, R.K., Tjoeng, F.S., Currie, M.G. (1995): Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.* **273**: 15-24.
- Copeland, R.A., Williams, J.M., Giannaras, J., Nurnberg, S., Covington, M., Pinto, D., Pick, S., Tarzaskos, J.M. (1994): Mechanism of selective inhibition of the inducible form of prostaglandin G/H synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 11202-11206.
- Cromlish, W.A., Kennedy, B.P. (1996): Selective inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 using intact insect cell assays. *Biochem. Pharmacol.* **52**: 1777-1785.
- Curtis, C.L., Hughes, C.E., Flannery, C.R., Little, C.B., Harwood, J.L., Caterson, B. (2000): *n*-3 Fatty acids specifically modulate catabolic factors involved in articular cartilage degradation. *J. Biol. Chem.* **275**: 721-724.
- Curtis-Prior, P. (2004): *The Eicosanoids*. Wiley, Cambridge, England.
- Daikoku, T., Wang, D., Tranguch, S., Morrow, J.D., Orsulic, S., DuBois, R.N., Dey, S.K. (2005): Cyclooxygenase-1 is a potential target for prevention and treatment of ovarian epithelial cancer. *Cancer Res.* **65**: 3735-3744.
- De Castagno, A.S. (1970): Presence of antibiotics in *Plantago paralias*. *Rev. Farm. (Argentina)*, **112**: 111-115.
- De la Puerta, R., Gutierrez, V.R., Hault, J.R.S. (1999): Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem. Pharmacol.* **57**: 445-449.
- Debrauwer, L., Maillard, C., Babadjamian, A., Vidal-Ollivier, E., Laget, M., Salmona, G., Afzal-Raffi, Z. (1989): Study in the chemical constituents of *Plantago cynops* L. and antibacterial evaluation of verbascoside. *Pharm. Acta Helv.* **64**: 183-187.
- Decaisne, M.J. (1852): Plantaginaceae. U: de Candolle, A.C. (ed.) *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis*, vol. 13 (I). Victoris Masson, Paris, France. 693-737.

- Demasi, M., Caughey, G.E., James, M.J., Cleland, L.G. (2000): Assay of cyclooxygenase-1 and 2 in human monocytes. *Inflamm. Res.* **49**: 737-743.
- Didna, B., Debnath, S., Harigaya, Y. (2007): Naturally Occurring Iridoids. A Review, Part 1. *Chem. Pharm. Bull.* **55**: 159-222.
- Ding, X., Hennig, R., Adrian, T.E. (2003): Lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism: new insights in treatment and chemoprevention of pancreatic cancer. *Mol. Cancer*, **2**: 10.
- Dulce H.S.S., Zhang, Y., Santos, L.A., Bolzani, V.S., Nair, M.G. (2007): Lipoperoxidation and cyclooxygenases 1 and 2 inhibitory compounds from *Iryanthera juruensis*. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 2569-2574.
- Egorov, T.A., Galkina, T.G., Balashova, T.A., Arsen'ev, A.S., Nikonorova, A.K., Babakov, A.V., Grishin, E.V. (2004): Phenolic glycoside isolated from seeds of the greater plantain (*Plantago major* L.). *Doklady Biochem. Biophys.* **396**: 132-135.
- El-Seedi, H.R., Ringbom, T., Torssell, K., Bohlin, L. (2003): Constituents of *Hypericum laricifolium* and their cyclooxygenase (COX) enzyme activities. *Chem. Pharm. Bull.* **51**: 1439-1440.
- Engelhardt, G., Bögel, R., Schnitzler, C., Utzmann, R. (1996): Meloxicam: influence on arachidonic acid metabolism. Part 1. *In vitro* findings. *Biochem. Pharmacol.* **51**: 21-28.
- Espin, J.C., Soler-Rivas, C., Wichers, H.J. (2000): Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 648-656.
- Ferrandiz, M.L., Ramachandran Nair A.G., Alcaraz, M.J. (1990): Inhibition of sheep platelet arachidonate metabolism by flavonoids from Spanish and Indian medicinal herbs. *Pharmazie*, **45**: 206-208.
- Fleer, H., Verspohl, E.J. (2007): Antispasmodic activity of an extract from *Plantago lanceolata* L. and some isolated compounds. *Phytomedicine*, **14**: 409-415.
- Folco, G., Murphy, R.C. (2006): Eicosanoid transcellular biosynthesis: from cell-cell interactions to *in vivo* tissue responses. *Pharmacol. Rev.* **58**: 375-388.
- Fons, F., Gargadenec, A., Rapior, S. (2008): Culture of *Plantago* species as bioactive components resource: a 20-year review and recent application. *Acta Bot. Gallica*, **155**: 277-300.



- Fons, F., Rapior, S., Gargadennec, A., Andary, C., Bessière, J.M. (1998): Volatile components of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). *Acta Bot. Gallica*, **145**: 265-269.
- Franzyk, H., Husum, T.L., Jensen, S.R. (1998): A caffeoyl phenylethanoid glycoside from *Plantago myosuros*. *Phytochem.* **47**: 1161-1162.
- Frohberg, P., Drutkowski, G., Wobst, I. (2006): Monitoring eicosanoid biosynthesis via lipoxygenase and cyclooxygenase pathways in human whole blood by single HPLC run. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**: 1317-1324.
- Futaki, N., Takahashi, S., Yokoyama, M., Arai, I., Higuchi, S., Otomo, S. (1994): NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity *in vitro*. *Prostaglandins*, **47**: 55-59.
- Gaddi, A., Cicero, A.F.G., Pedro, E.J. (2004): Clinical perspectives of anti-inflammatory therapy in the elderly: the lipoxygenase (LOX)/cyclooxygenase (COX) inhibition concept. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **38**: 201-212.
- Gálvez, M., Martín-Cordero, C., Houghton, P.J., Ayuso, M.J. (2005a): Antioxidant activity of methanol extracts obtained from *Plantago* species. *J. Agric.Food Chem.* **53**: 1927-1933.
- Gálvez, M., Martín-Cordero, C., Houghton, P.J., Ayuso, M.J. (2005b): Antioxidant activity of *Plantago bellardii* All. *Phytoter. Res.* **19**: 1074-1076.
- Gálvez, M., Martín-Cordero, C., López-Lázaro, M., Cortés, F., Ayuso, M.J. (2003): Cytotoxic effect of *Plantago* spp. on cancer cell lines. *J. Ethnopharmacol.* **88**: 125-130.
- Gierse, J., Nickols, M., Leahy, K., Warner, J., Zhang, Y., Cortes-Burgos, L., Carter, J., Seibert, K., Masferrer, J. (2008): Evaluation of COX-1/COX-2 selectivity and potency of a new class of COX-2 inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.* **588**: 93-98
- Gierse, J.K., Hauser, S.D., Creely, D.P., Koboldt, C., Rangwala, S.H., Isakson, P.C., Seibert, K. (1995): Expression and selective inhibition of the constitutive and inducible forms of human cyclo-oxygenase. *Biochem. J.* **305**: 479-484.
- Giugliano, D., Ceriello, A., Paolisso, G. (1996): Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*, **19**: 257-267.
- Glaser, K., Sung, M.L., O'Neill, K., Belfast, M., Hartman, D., Carlson, R., Kreft, A., Kubrak, D., Hsiao, C.L. and Weichman B. (1995): Etodolac selectively inhibits human prostaglandin G/H synthase 2 (PGHS-2) versus human PGHS-1. *Eur. J. Pharmacol.* **281**: 107-111.

- Gomez-Flores, R., Calderon, C.L., Scheibel, L.W., Tamez-Guerra, P., Rodriguez-Padilla, C., Tamez-Guerra, R., Weber, R.J. (2000): Immunoenhancing properties of *Plantago major* leaf extract. *Phytother. Res.* **14**: 617–622.
- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. (1982): Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup> N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**: 131-138.
- Grubešić, R. J., Vladimir-Knežević, S. (2004): Qualitative phytochemical characterization of some *Plantago* species. *Farm. Glas.* **60**: 297-309.
- Guil, J.L., Torija, M.E., Giménez, J.J., Rodríguez, I. (1996): Identification of fatty acids in edible wild plants by gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, **719**: 229-235.
- Guillén, M.E.N., da Silva Emim, J.A., Souccar, C., Lapa, A.J. (1997): Analgesic and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of *Plantago major* L. *Pharmaceut. Biol.* **35**: 99-104.
- Gutteridge, J.M.C. (1987): Ferrous-salt-promoted damage to deoxyribose and benzoate. The increased effectiveness of hydroxyl-radical scavengers in the presence of EDTA. *Biochem J* **243**: 709-714.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (2006): *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press, Oxford, England.
- Halliwell, B. (2006): Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* **141**: 312-322.
- Halliwell, B. (2007): Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem. J.* **401**: 1-11.
- Halliwell, B. (2009): The wanderings of free radical. *Free Radic. Biol. Med.* **46**: 531-542.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C (1986): Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine-some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* **2**, **46**: 501-14.
- Hammarström, S. (1983): Stereospecific elimination of hydrogen at C-10 in eicosapentaenoic acid during the conversion to leukotriene C<sub>5</sub>. *J. Bio. Chem.* **258**: 1427-1430.
- Handjieva, N., Saadi, H. (1991): Iridoid glucosides from *Plantago altissima* L., *Plantago lanceolata* L., *Plantago atrata* Hoppe and *Plantago argentea* Chaix. *Z. Naturforsch. C*, **46**: 963-965.

- Harborne, J.B., Williams, C.A. (1971): 6-Hydroxyluteolin and scutellarein as phyletic markers in higher plants. *Phytochem.* **10**: 367-378.
- Harrison, D., Griendling, K.K., Landmesser, U., Hornig, B., Drexler, H. (2003): Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am. J. Card.* **91**: 7–11.
- Hausmann, M., Obermeier, F., Paper, D.H., Balan, K., Dunger, N., Menzel, K., Schoelmerich, J., Herfarth, H., Rogler, G. (2007): In vivo treatment with the herbal phenylethanoid acetone ameliorates intestinal inflammation in dextran sulphate sodium-induced colitis. *Clin. Exp. Immunol.* **148**: 373–381.
- Havsteen, B. H. (2002): The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* **96**: 67–202.
- Hawkey, C.J. (1999): COX-2 inhibitors. *Lancet*, **353**: 307-314.
- Haznagy, A., Toth, G., Bula, E. (1976): Apigenin-7-O-monoglucosid im Kraut von *Plantago lanceolata*. *Pharmazie*, **31**: 482-483.
- Haznagy, A. (1970): Recent results with plantaginis folium (Plantain leaves). *Herba Hung.* **9**: 57-63.
- Hecker, M., Ullrich, V. (1989): On the mechanism of prostacyclin and thromboxane A<sub>2</sub> biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **264**: 141–150.
- Heimler, D., Isolani, L., Vignolini, P., Tombelli, S., Romani, A. (2007): Polyphenol content and antioxidative activity in some species of freshly consumed salads. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 1724-1729.
- Helyes, Z., Szabó, Á., Németh, J., Jakab, B., Pintér, E., Bánvölgyi, Á., Kereskai, L., Kéri, G., Szolcsányi, J. (2004): Antiinflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in a Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model in the rat. *Arthritis Care Res.* **50**: 1677–1685.
- Herold, A., Cremer, L., Calugaru, A., Tamaş, V., Ionescu, F., Manea, S., Szegli, G. (2003): Antioxidant properties of some hydroalcoholic plant extracts with anti-inflammatory activity. *Roum. Arch. Microbiol. Immunol.* **62**: 217-227.
- Herschman, H.R. (1996): Prostaglandin synthase 2. *Biochim. Biophys. Acta*, **1299**: 125–140.
- Hong, S.H., Avis, I., Vos, M.D., Martínez, A., Treston, A.M., Mulshine, J.L. (1999): Relationship of arachidonic acid metabolizing enzyme expression in epithelial cancer cell lines to the growth effect of selective biochemical inhibitors. *Cancer Res.* **59**: 2223-2228.

- Horvath, E., Kovacs, K., Scheithauer, B.W., Randall, R.V., Laws, E.R.Jr., Thorner, M.O., Tindall, G.T., Barrow, D.L. (1983): Pituitary adenomas producing growth hormone, prolactin, and one or more glycoprotein hormones: a histologic, immunohistochemical, and ultrastructural study of four surgically removed tumors. *Ultrastruct. Pathol.* **5**: 171-183.
- Hostettmann, K., ed. (1991): Assays for bioactivity: Assays for immunomodulation and effects on mediators of inflammation. U: Dey, P.M., Harborne, J.B. *Methods in plant biochemistry, vol 6*. Academic Press Limited, London, England. 207-211.
- Jäger, A.K., Eldeen, I.M.S., van Staden, J. (2007): COX-1 and -2 activity of rose hip. *Phytother. Res.* **21**: 1251-1252.
- Jančić, R. (2002): *Botanika Farmaceutika*. Javno preduzeće službeni list SRJ, Beograd, Srbija. 212-213.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W.W., Fong, H.H.S., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C., Pezzuto, J.M. (1997): Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, **275**: 218 –220.
- Jang, M., Pezzuto J.M. (1998): Effects of resveratrol on 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced oxidative events and gene expression in mouse skin. *Cancer Lett.*, **134**: 81-89.
- Janković, T., Šavikin, K., Zdunić, G., Miljković, N., Beara, I., Balog, K., Mimica-Dukić, N. (2010): Quantitative determination of aucubin in seven *Plantago* species using HPLC, HPTLC and LC-ESI-MS methods. *Anal. Lett.*, prihvaćeno za štampu
- Janković, M., Gajić, M. (1974): Familija *Plantaginaceae* L. U: Josifović, M. (ed.) *Flora SR Srbije, vol.6*. SANU, Beograd, Srbija. 318-355.
- Jasrai, Y.T., Yadava, N., Mehta, A.R. (1993): Somatic embryogenesis from leaf induced cell cultures of *Plantago ovata* Forsk. *J. Herbs, Spices & Med. Plants*, **1**: 11-16.
- Jurišić-Grubešić, R., Vladimir-Knežević, S. (2004): Qualitative phytochemical characterization of some *Plantago* species. *Farm. Glas.* **60**: 297–309.
- Jurišić-Grubešić, R., Vuković, J., Kremer, D., Vladimir-Knežević, S. (2004): Spectrophotometric method for polyphenol analysis: Prevalidation and application on *Plantago* L. species. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **39**: 837-842.

- Kameoka, H., Wang, C.P., Yokoyama, K. (1979): Constituents of the essential oil from *Plantago asiatica* L. *Yakugaku Zasshi*, **99**: 95-97.
- Kanbi, V.H., Chakraborty, M.K. (1990): Biochemical changes in developing seeds of isabgol (*Plantago ovata* Forsk.). *Indian J. Plant Physiol.* **33**: 286-293.
- Kantarci, A., Van Dyke, T.E. (2003): Lipoxins in chronic inflammation. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **14**: 4-12.
- Kardošová, A., Machová, E. (2006): Antioxidant activity of medicinal plant polysaccharides. *Fitoterapia*, **77**: 367-373.
- Kargman, S., Wong, E., Greig, G.M., Falgoutyret, J.P., Cromlish, W., Ethier, D., Yergey, J.A., Riendeau, D., Evans, J.F., Kennedy, B., Tagari, P., Francis, D.A., O'Neill, G.P. (1996): Mechanism of selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase-1 and -2 in intact cells. *Biochem. Pharmacol.* **52**: 1113-1125.
- Katalinić, V., Miloš, M., Kulišić, T., Jukić, M. (2006): Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem.* **94**: 550-557.
- Kawai, S., Nishida, S., Kato, M., Furumaya, Y., Okamoto, R., Koshino, T., Mizushima, Y. (1998): Comparison of cyclooxygenase-1 and -2 inhibitory activities of various nonsteroidal anti-inflammatory drugs using human platelets and synovial cells. *Eur. J. Pharmacol.* **347**: 87-94.
- Kawashty, S.A., Gamal-El-Din, E., Abdalla, M. F., Saleh, N.A.M. (1994): Flavonoids of *Plantago* species in Egypt. *Biochem. Syst. Ecol.* **22**: 729-733.
- Kepes, J.J., Kepes, M. (1969): Predominantly cerebral forms of histiocytosis-X. *Acta Neuropath.* **14**: 77-98.
- Khalil, M.Y., Moustafa, A.A., Naguib, N.Y. (2007): Growth, phenolic compounds and antioxidant activity of some medicinal plants grown under organic farming condition. *World J. Agric. Sci.* **3**: 451-457.
- Kim, H.P., Mani, I., Iversen, L., Ziboh, V.A. (1998): Effects of naturally occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxigenase from guinea pigs. *Prostag. Leukotr. Ess.* **58**: 17-24.
- Klein, T., Nüsing, R.M., Pfeilschifter, J., Ullrich, V. (1994): Selective inhibition of cyclooxygenase 2. *Biochem. Pharmacol.* **48**: 1605-1610.
- Koračević, D., Bjelaković, G., Đorđević, V., Nikolić, J., Pavlović D., Kocić, G. (1996): *Biohemija*. Savremena administracija, Beograd, Jugoslavija.

- Krasnov, M.S., Margasyuk, D.V., Yamskov, I.A., Yamskova, V.P. (2003): Effect of extremely low doses of the novel regulatory proteins obtained from plants. *Radiatsionnaya Biologiya, Radioekologiya*, **43**: 269-272.
- Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve P. (2007.): Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Prog. Lipid Res.* **46**: 244-282.
- Laneuville, O., Breuer, D.K., Dewitt, D.L., Hla, T., Funk, C.D., Smith, W.D. (1994): Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by nonsteroidal anti inflammatory drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **271**: 927-934.
- Lebedev-Kosov, V.I., Bykov, V.I., Glyzin, V.I. (1978): Flavonoids of *Plantago major*. *Chem. Nat. Compd.* **14**: 223.
- Leslie, C.C. (1997): Properties and regulation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* **272**: 16709-16712.
- Li, R.W., Lin, G.D., Myers, S.P., Leach, D.N. (2003): Anti-inflammatory activity of Chinese medicinal vine plants. *J. Ethnopharmacol.* **85**: 61-67.
- Long, C., Moulis, C., Stanislas, E., Fouraste, I. (1995): Aucuboside and catalpol in *Plantago lanceolata* L., *Plantago major* L. and *Plantago media* L. leaves. *J. Pharm. Belg.* **50**: 484-488.
- Lundström, S.L., D’Alexandri, F.L., Nithipatikom, K., Haeggström, J.Z., Wheelock, Å.M., Wheelock, C.E. HPLC/MS/MS based approaches for identification and quantification of eicosanoids. U: Armstrong, D. (ed.) *Lipidomics, vol.1, Methods and Protocols*. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, 2009. 161-187.
- MacDonald-Wicks, L.K., Wood, L.G., Garg, M.L. (2006): Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. *J. Sci. Food Agric.* **86**: 2046-2056.
- Maksyutina, N.P. (1971a): Hydroxycinnamic acids of *Plantago major* and *Pl. lanceolata*. *Chem. Nat. Compd.* **7**: 795.
- Maksyutina, N.P. (1971b): Baicalein and scutellarein derivatives in the leaves of *Plantago major*. *Chem. Nat. Compd.* **7**: 352.
- Marchesan M., Paper, D.H., Hose, S., Franz, G. (1998): Investigation of the antiinflammatory activity of liquid extracts of *Plantago lanceolata* L. *Phytoter. Res.* **12**: 33-34.

- Marchesan, M., Hose, S., Paper., D.H., Franz, G. (1998): New investigation of anti-inflammatory activity of *Plantago lanceolata* extracts. *Dtsch. Apoth.-Ztg.* **138**: 2987-2992.
- Marks, F., Fürstenberg, G. (ed.) (1999): Prostaglandins, leukotrienes and other eicosanoids: from biogenesis to clinical application. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Marnett, L. J., Rowlinson, S.W., Goodwin, D.C., Kalgutkar, A.S., Lanzo, C.A (1999): Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *J. Biol. Chem.* **274**: 22903–22906.
- Mayes, P.A., Botham, K.M. (2003): Metabolism of unsaturated fatty acids and eicosanoids. U: *Harper's Illustrated Biochemistry*, Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. (ed.). Lange Medical Books/McGraw-Hill, Columbus, Ohio. 190-196.
- Mcfadden, D.W., Riggs D.R., Jackson, B.J., Cunningham, C. (2006): Additive effects of Cox-1 and Cox-2 inhibition on breast cancer *in vitro*. *Int. J. Oncol.* **29**: 1019-1023
- McMahon, B., Godson, C. (2004): Lipoxins: endogenous regulators of inflammation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **286**: 189-210.
- Meade, E.A., Smith, W.L., DeWitt, D.L. (1993): Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Biol. Chem.* **268**: 6610-6614.
- Michaelsen, T.E., Gilje, A., Samuelsen, A.B., Høgåsen, K., Paulsen, B.S. (2000): Interaction between human complement and a pectin type polysaccharide fraction, PMII, from the leaves of *Plantago major* L. *Scand. J. Immunol.* **52**: 483-490.
- Mitchell, J.A, Akarasereenont, P., Thiemermann, C., Flower, R., Vane, J.R. (1993): Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 11693-11697.
- Mølgaard, P. (1986): Population genetics and geographical distribution of caffeic acid esters in leaves of *Plantago major* in Denmark. *J. Ecol.* **74**: 1127-1137.
- Mulabagal, V., Ngouajio, M., Nair, A., Zhang, Y., Gottumukkala, A.L., Nair, M.G. (2010): *In vitro* evaluation of red and green lettuce (*Lactuca sativa*) for functional food properties. *Food Chem.* **118**: 300-306.

- Murai, M., Tamayama, Y., Nishibe, S. (1995): Phenylethanoids in the herb of *Plantago lanceolata* and inhibitory effect on arachidonic acid-induced mouse ear edema. *Planta Med.* **61**: 479-480.
- Murai, Y., Kanemoto T., Iwashina T. (2008): Flavone glucuronides from *Plantago hakusanensis* endemic to Japan. *Biochem. Syst. Ecol.* **36**: 815-816.
- Mutoh, M., Takahashi, M., Fukuda, K., Matsushima-Hibiya, Y., Mutoh, H., Sugimura, T., Wakabayashi, K. (2000): Suppression of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells by chemopreventive agents with a resorcin-type structure. *Carcinogenesis*, **21**: 959-963.
- Nakatsuka, M., Osawa, Y. (1994): Selective inhibition of the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism by L-arginine or sodium nitroprusside in intact human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**: 1630-1634.
- Nie, D., Honn, K.V. (2002): Cyclooxygenase, lipoxygenase and tumor angiogenesis. *Cell Mol. Life Sci.* **59**: 799–807.
- Nie, D., Tang, K., Diglio, C., Honn, K.V. (2000): Eicosanoid regulation of angiogenesis: role of endothelial arachidonate. *Blood*, **95**: 2304-2311.
- Nigam, S., Zefiriou, M., Deva, R., Ciccoli, R., Roux-Van der Merwe, R. (2007): Structure, biochemistry and biology of hepoxilins. *FEBS J.* **274**: 3503-3512.
- Nishibe, S., Murai, M., Tamayama, Y. (1995): Studies on the constituents of Plantaginis herba 7. Flavonoids from *Plantago asiatica* and *P. hostifolia*. *Natural Med.* **49**: 340-342.
- Nishikimi, M., Rao, N.A., Yagi, K. (1972): The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem. Biophys Res. Co.* **46**: 849-854.
- Nogata, Y., Sekiya, K., Ohta, H., Kusumoto, K.I., Ishizu, T. (2001): Inhibitors of platelet lipoxygenase from ponkan fruit. *Phytochemistry* **56**: 729–732.
- Noreen, Y., Ringbom, T., Perera, P., Danielson, H., Bohlin, L. (1998): Development of a radiochemical cyclooxygenase-1 and -2 in vitro assay for identification of natural products as inhibitors of prostaglandin biosynthesis. *J. Nat. Prod.* **61**: 2-7.
- Noriko, K., Keizo, S. (1997): Effects of Perilla extract on arachidonic acid metabolism. *Bull. Shikoku Nat. Agric. Exp. Station* **61**: 23–29.



- Noro, Y., Hisata, Y., Okuda, K., Tomoko, K., Yumi, K., Toshihiro, T., Eiji, S., Sansei, N., Michiko, S. (1991): Pharmacognostical studies of *Plantaginis* herba (VII) on the phenylethanoid contents of *Plantago* spp. *Jap. J. Pharm.* **1**: 24-28.
- Ogino, N., Ohki, S., Yamamoto, S., Hayaishi, O. (1978): Prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. Inactivation and activation by heme and other metalloporphyrins. *J. Biol. Chem.* **253**: 5061-5068.
- O'Neill, G.P., Mancini, J.A., Kargman, S., Yergey, J., Kwan, M.Y., Falgoutyret, J.P., Abramovitz, M., Kennedy, B.P., Ouellet, M., Cromlish, W. (1994): Overexpression of human prostaglandin G/H synthase-1 and -2 by recombinant vaccinia virus: inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and biosynthesis of 15-hydroxyeicosatetraenoic acid. *Mol. Pharmacol.* **45**: 245-254.
- Pailer, V.M., Haschke-Hofmeister, E. (1969): Inhaltstoffe aus *Plantago major*. *Planta Med.* **17**: 139-145.
- Pairet, M., Engelhardt, G. (1996): Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implication. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **10**:1-15.
- Pairet, M., van Ryn J. (1998): Experimental models used to investigate the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Inflamm. Res.* **47**: S93-S101.
- Palmeiro, N.S., Almeida, C. E., Ghedini, P.C., Goulart, L.S., Baldisserotto, B. (2002): Analgesic and anti-inflammatory properties of *Plantago australis* hydroalcoholic extract. *Acta Farm. Bonaerense*, **21**: 89-92.
- Park, K.S., Chang, I.M. (2004): Anti-inflammatory activity of aucubin by inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$  production in RAW 264.7 cells. *Planta Med.* **70**: 778-779.
- Park, K.S., Kim, B.H., Chang, I. M. (2007): Inhibitory potencies of several iridoids on cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2 enzymes activities, tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide production in Vitro. *Evid-Based Compl. Alt.*, 1-5.
- Patrignani, P., Panara, M.R., Greco, A., Fusco, O., Natoli, C., Iacobelli, S., Cipollone, F., Ganci, A., Cr  minon, C., Maclouf, J. (1994): Biochemical and pharmacological characterization of the cyclooxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxide synthases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **271**: 1705-1710.

- Patrignani, P., Panara, M.R., Sciulli, M.G., Santini, G., Renda, G., Patrono, C. (1997): Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J. Physiol. Pharmacol.* **48**: 623-631.
- Peters-Golden, M., Henderson, W.R.Jr. (2007): Leukotrienes. *N. Engl. J. Med.* **357**: 1841-1854.
- Peyroux, J., Mehri, M.H., Plat, M., Rossignol, P., Velette, G. (1972): *Plantago arenaria* Walds. & Kit. Isolation of narcotin and a new alkaloid arenaine. *Ann. Pharm. Fr.* **30**: 51-54.
- Piao, Y.S., Du, Y.C., Oshima, H., Jin, J.C., Nomura, M., Yoshimoto, T., Oshima, M. (2008): Platelet-type 12-lipoxygenase accelerates tumor promotion of mouse epidermal cells through enhancement of cloning efficiency. *Carcinogenesis*, **29**: 440–447.
- Pietta, P., Simonetti, P., Mauri, P. (1998). Antioxidant activity of selected medical plants. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 4487-4490.
- Pilger, R. (1937): Plantaginaceae. U: Engler A., Diels, L. (ed.) *Das Pflanzenreich*, vol. 4. Wilhelm Engelmann, Leipzig, Germany. 1-466.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J., Shahabimajd, N. (2006): Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of selected Iranian medicinal plants. *Afr. J. Biotechnol.* **5**: 1142-1145.
- Prasit, P. (1997): New highly selective COX-2 inhibitors. U: *Proceedings of the William Harvey Research Conference: Selective COX-2 Inhibitors*. Phuket, Thailand, Sept. 17-19.
- Prasit, P., Black, W.C., Chan, C.C., Ford-Hutchinson, A.W., Gauthier, J.Y., Gordon, R., et al. (1995): L-745337: A selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Med. Chem. Res.* **5**: 364-374.
- Prior, R.M., Lundgaard, N.H., Light, M.E., Stafford, G.I., van Staden, J., Jäger, A.K. (2007): The polyacetylene faltarindiol with COX-1 activity isolated from *Aegopodium podagraria* L. *J. Ethnopharmacol.* **113**: 176-178.
- Pryor, W.A., Cornicelli J.A., Devall L.J., Tait B., Trivedi B.K., Witiak D.T., Mindgan, W.U. (1993): A rapid screening test to determine the antioxidant potencies of natural and synthetic antioxidants. *J. Org. Chem.* **58**: 3521-3532.
- Rahn, K. (1978): Nomenclatorial changes within the genus *Plantago* L. Intraspecific taxa and subdivisions of genus. *Bot. Tidsskr.* **73**: 106-111.

- Rahn, K. (1996): A phylogenetic study of the Plantaginaceae. *Bot. J. Linn. Soc.* **120**: 145-198.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Moore, P. K. (2004): *Farmakologija*. Data Status, Beograd, Srbija.
- Ravn, H., Nishibe, S., Sasahara, M., Xuebo, L. (1990): Phenolic compounds from *Plantago asiatica*. *Phytochem.* **29**: 3627-3631.
- Reddy, G.R., Ueda, N., Hada, T., Sackeyfio, A.C., Yamamoto, S., Hano, Y., Aida, M., Nomura, T. (1991): A prenylflavon, artonin E, as arachidonate 5-lipoxygenase inhibitor. *Biochem. Pharmacol.* **41**: 115–118.
- Reddy, S.T., Herschman, H.R. (1994): Ligand-induced prostaglandin synthesis requires expression of the TIS10/PGS-2 prostaglandin synthase gene in murine fibroblasts and macrophages. *J. Biol. Chem.* **269**: 15473–15480.
- Riendeau, D., Percival, M.D., Boyce, S., Brideau, C., Charleson, S., Cromlish, W., Ethier, D., Evans, J., Falgoutyret, J.P., Ford-Hutchinson, A.W., Gordon, R., Greig, G., Gresser, M., Guay, J., Kargman, S., Léger, S., Mancini, J.A., O'Neill, G., Ouellet, M., Rodger, I.W., Thérien, M., Wang, Z., Webb, J.K., Wong, E., Xu, L., Young, R.N., Zamboni, R., Prasit, P., Chan, C .C. (1997): Biochemical and pharmacological profile of a tetrasubstituted furanone as a highly selective COX-2 inhibitor. *Br. J. Pharmacol.* **121**:105-117.
- Ringbom, T., Huss, U., Stenholm, Å., Flock, S., Skattebøl, L., Perera, P., Bohlin, L. (2001): COX-2 inhibitory effects of naturally occurring and modified fatty acids. *J. Nat. Prod.* **64**: 745-749.
- Ringbom, T., Segura, L., Noreen, Y., Perera, P., Bohlin, L. (1998): Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. *J. Nat. Prod.* **61**: 1212-1215.
- Rodríguez-Cabezas, M.E., Gálvez, J., Camuesco, D., Lorente, M.D., Concha, A., Martinez-Augustin, O., Redondo, L., Zarzuelo, A. (2003): Intestinal anti-inflammatory activity of dietary fiber (*Plantago ovata* seeds) in HLA-B27 transgenic rats. *Clin. Nutr.* **22**: 463–471.
- Rombi, M. (1992): *Cent plantes médicinales*. Romart, Nice, France. 298.
- Rønsted, N., Chase, M.W., Albach, D.C., Bello, M.A. (2002): Phylogenetic relationships within *Plantago* (Plantaginaceae): evidence from nuclear ribosomal ITS and plastid trnL-F sequence data. *Bot. J. Linn. Soc.* **139**: 323–338.

- Rønsted, N., Franzyk, H., Mølgaard, P., Jaroszewski, J.W., Jensen, S.R., (2003): Chemotaxonomy and evolution of *Plantago* L. *Plant. Syst. Evol.* **242**: 63-82.
- Rønsted, N., Göbel, E., Franzyk, H., Jensen, S.R., Olsen, C.E. (2000): Chemotaxonomy of *Plantago*. Iridoid glucosides and caffeoyl phenylethanoid glycosides. *Phytochem.* **55**: 337-348.
- Roth, G.J., Stanford, N., Majerus, P.W. (1975): Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**: 3073-3076.
- Saeed, S.A., Simjee, R.U., Shamim, G., Gilani, A.H. (1995): Eugenol: a dual inhibitor of platelet-activating factor and arachidonic acid metabolism. *Phytomedicine*, **2**: 23–28.
- Safayhi, H., Mack, T., Sabieraj, J., Anazodo, M.I., Subramanian, L.R., Ammon, H.P.T. (1992): Boswellic acids: Novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **261**: 1143-1146.
- Sakuma, S., Fujimoto, Y., Tsunomori, M., Tagano, S., Nishida, H., Baba, K., Fujita, T. (1998): Effects of daphnodorin A, B, and C, new flavans isolated from traditional Chinese medicine, on the 12-lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism of arachidonic acid in rabbit platelets. *Prostag. Leukotr. Ess.* **58**: 143–146.
- Sakuma, S., Fujimoto, Y., Tsunomori, M., Tagano, S., Nishida, H., Baba, K., Fujita, T. (1998): Effects of daphnodorin A, B, and C, new flavans isolated from traditional Chinese medicine, on the 12-lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism of arachidonic acid in rabbit platelets. *Prostag. Leukotr. Ess.* **58**: 143-146.
- Samuelsen, A.B, Cohen, E.H., Paulsen, B.S., Brüll, L.P., Thomas-Oates, J.E. (1999): Structural studies of a heteroxylan from *Plantago major* L. seeds by partial hydrolysis, HPAEC-PAD, methylation and GC-MS, ESMS and ESMS/MS. *Carbohydr. Res.* **315**: 312-318.
- Samuelsen, A.B, Paulsen, B.S., Wold, J.K., Otsuka, H., Yamada, H., Espevik, T. (1995): Isolation and partial characterization of biologically active polysaccharides from *Plantago major* L. *Phytother. Res.* **9**: 211-218.
- Samuelsen, A.B. (2000): The traditional uses, chemical constituents, and biological activities of *Plantago major* L. A review. *J. Ethnopharmacol.* **71**: 1-21.
- Sánchez-Moreno, C. (2002): Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. Tech. Int.* **8**: 121-137.

- Sarić, M.R. (1989): *Lekovite biljke SR Srbije*, vol.598. SANU, Beograd, Srbija. 428-432.
- Satoh, K., Ozaki, Y., Yatomi, Y., Kume, S. (1994): Effects of sulfonylurea agents on platelet arachidonic acid metabolism; study on platelet homogenates. *Biochem. Pharmacol.* **48**: 1053-1055.
- Schneider, I., Bucar, F. (2005): Lipoxygenase inhibitors from natural plant sources. Part 2: medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate 12-lipoxygenase, 15-lipoxygenase and leukotriene receptor antagonists. *Phytoter. Res.* **19**: 263-272.
- Schneider, I., Gibbons, S., Bucar, F. (2004): Inhibitory activity of *Juniperus communis* on 12(*S*)-HETE production in human platelets. *Planta Med.* **70**: 471-474.
- Scholz, M., Ulbrich, H.K., Soehnlein, O., Lindbom, L., Mattern, A., Dannhardt, G. (2009): Diaryl-dithiolanes and -isothiazoles: COX-1/COX-2 and 5-LOX-inhibitory,  $\cdot$ OH scavenging and anti-adhesive activities. *Bio. Med. Chem.* **17**: 558-568.
- Sekiya, K., Okuda, H. (1982): Selective inhibition of platelet lipoxygenase by baicalein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **105**: 1090-1095.
- Selvam, C., Sanjay, M., Jachak, C. (2004): A cyclooxygenase (COX) inhibitory biflavonoid from the seeds of *Semecarpus anacardium*. *J. Ethnopharmacol.* **95**: 209-212.
- Siemoneit, U., Hofmann, B., Kather, N., Lamkemeyer, T., Madlung, J., Franke, L., Schneider, G., Jauch, J., Poeckel, D., Werz, O. (2008): Identification and functional analysis of cyclooxygenase-1 as a molecular target of boswellic acids. *Biochem. Pharmacol.* **75**: 503-513.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Ramuela-Raventos, R.M. (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method. Enzymol.* **299**: 152-178.
- Skari, K.P., Malterud, K.E., Haugli, T. (1999a): Radical scavengers and inhibitors of enzymatic lipid peroxidation from *Plantago major*, a medicinal plant. U: Kumpulainen, J.T., Salone, J.T. (ed.) *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Conference of Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition, Health and Disease*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, England. 200-202.
- Skari, K.P., Malterud, K.E., Haugli, T. (1999b): Radical scavengers and inhibitors of enzymatic lipid peroxidation from *Plantago major*, a medicinal plant. *2000 Years of*

*Natural Product Research – Past, Present and Future*. Amsterdam, the Netherlands. P 495.

- Slezak, J., Tribulova, N., Pristacova, J.B., Uhrík, T., Thomas, N., Khaper, N., Kaul, N., Singal, P. K. (1995): Hydrogen peroxide changes in ischemic and reperfused heart. Cytochemistry and biochemical and X-ray microanalysis. *Am. J. Pathol.* **147**: 772-781.
- Smith, C.J., Zhang, Y., Koboldt, C.M., Muhammad, J., Zweifel, B.S., Shaffer, A., Talley, J.J., Masferrer, J.L., Seibert, K., Isakson, P.C. (1998): Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 13313–13318.
- Smith, W.L. (1989): The eicosanoids and their biochemical mechanism of action. *Biochem. J.* **259**: 315-324.
- Smith, W.L., DeWitt, D.L. (1996): Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. *Adv. Immunol.* **62**: 167-215.
- Smith, W.L., DeWitt, D.L., Garavito, D.M. (2000): Cyclooxygenases: structural, cellular and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* **69**: 145-182.
- Song, I., Ball, T.M., Smith, W.L. (2001): Different suicide inactivation processes for the peroxidase and cyclooxygenase activities of prostaglandin endoperoxide H synthase-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**: 869-875.
- Souri, E., Amin, G., Farsam, H., Barazandeh Tehrani M. (2008): Screening of antioxidant activity and phenolic content of 24 medicinal plant extracts. *DARU*, **16**: 83-87.
- Stanisavljević, I., Stojičević, S., Veličković, D., Lazić, M., Veljković, V. (2008): Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the extracts from *Plantain* (*Plantago major* L.) leaves. *Separ. Sci. Technol.* **43**: 3652-3662.
- Starčević, V.P. (1999): Eikosanoidni sistemi. U: *Kompendijum iz endokrinologije*. Medicinski fakultet, Beograd, Srbija.
- Sud'ina, G.F., Pushkareva, M.A., Shephard, P., Klein, T. (2008): Cyclooxygenase (COX) and 5-lipoxygenase (5-LOX) selectivity of COX inhibitors. *Prostag. Leukotr. Ess.* **78**: 99-108.
- Suzuki, H., Ueda, T., Juranek, I., Yamamoto, S., Katoh, T., Node, M., Suzuki, T. (2000): Hinokitiol, a selective inhibitor of the platelet-type isozyme of arachidonate 12-lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**: 885–889.

- Swiatek, K., Kurowska, A., Gora, J. (1980): Chemical composition of some *Plantago* species seed oil. *Herba Pol.* **4**: 213-217.
- Swinney, D.C., Mak, A.Y., Barnett, J., Ramesha, C.S. (1997): Differential allosteric regulation of prostaglandin H synthase 1 and 2 by arachidonic acid. *J. Biol. Chem.* **272**: 12393–12398.
- Takabatake, M., Hishinuma, T., Suzuki, N., Chiba, S., Tsukamoto, H., Nakamura, H., Saga, T., Tomioka, Y., Kurose, A., Mizugaki, M. (2002): Simultaneous quantification of prostaglandins in human synovial cell-cultured medium using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Prostag. Leukotr. Ess.* **67**: 51-56.
- Taskova, R., Evstatieva, L., Handjieva, N., Popov, S. (2002): Iridoid patterns of genus *Plantago* L. and their systematic significance. *Z. Naturforsch. C*, **57**: 42-50.
- Taskova, R., Handjieva, N., Evstatieva, L., Popov, S. (1999): Iridoid glucosides from *Plantago cornuti*, *Plantago major* and *Veronica cymbalaria*. *Phytochem.* **52**: 1443-1445.
- Tatum, V.L., Changchit, C., Chow C.K. (1990): Measurement of malondialdehyde by HPLC with fluorescence detection. *Lipids*, **25**: 226-229.
- Tavares, I.A., Bishai, P.M., Bennett, A. (1995): Activity of nimesulide on constitutive and inducible cyclooxygenases. *Arzneimittelforschung/Drug. Res.* **45**: 1093-1095.
- Thunnissen, M.M.G.M., Nordlund, P., Haeggström, J.Z. (2001): Crystal structure of human leukotriene A4 hydrolase, a bifunctional enzyme in inflammation. *Nature Struct. Mol. Bio.* **8**: 131-135.
- Tosun, F. (1995): Chemical constitution and medical usage of *Plantago* L. species. *Hacettepe Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi*, **15**: 23-32.
- Tucakov, J. (1997): *Lečenje biljem*. Rad, Beograd, Srbija. 242-245.
- Turel, I., Ozbek, H., Erten, R., Oner, A.C., Cengiz, N., Yilmaz, O. (2009): Hepatoprotective and anti-inflammatory activities of *Plantago major* L. *Indian J. Pharmacol.* **41**:120-124.
- Tutin, T.G., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (ed.) (1976): *Flora Eurpoea, vol. 4, Plantaginaceae to compositae (and Rubiaceae)*. Cambridge University Press, Cambridge, England. 38-44.
- van der Donk, W.A., Tsai, A.L., Kulmacz, R.J. (2002): The cyclooxygenase reaction mechanism. *Biochemistry*, **41**: 15451-15458.

- Vavreckova, C., Gawlik, I., Müller, K. (1996): Benzophenanthridine alkaloids of *Chelidonium majus*; I. Inhibition of 5- and 12-lipoxygenase by a non-redox mechanism. *Planta. Med.* **62**: 397–401.
- Velasco-Lezama, R., Tapia-Aguilara, R., Román-Ramos, R., Vega-Avila, E., Pérez-Gutiérrez, M.S. (2006): Effect of *Plantago major* on cell proliferation *in vitro*. *J. Ethnopharmacol.* **103**: 36-42.
- Vergne, P., Bertin, P., Liagre, B., Bonnet, C., Pairet, M., Rigaud, M., et al. (1997): Differential inhibition of COX-1 and COX-2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cultured synovial cells (abstract). *Arthritis Rheum.* **40**: 375.
- Vigo, E., Cepeda, A., Gualillo, O., Perez-Fernandez, R. (2005): In-vitro anti-inflammatory activity of *Pinus sylvestris* and *Plantago lanceolata* extracts: effect on inducible NOS, COX-1, COX-2 and their products in J774A.1 murine macrophages. *J. Pharm. Pharmacol.* **57**: 383-391.
- Wang, Z., Webb, J.K., Wong, I., Xu, L., Young, R.N., Zamboni, R., Prasit, P., Chan, C.C. (1997): Biochemical and pharmacological profile of a tetrasubstituted furanone as a highly selective COX-2 inhibitor. *Br. J. Pharmacol.* **121**: 105-117.
- Warner, T. (1997): Differential inhibition of COX-1/COX-2 by NSAIDs in human systems. U: *Proceedings of the William Harvey Research Conference: Selective COX-2 Inhibitors*. Phuket, Thailand, Sept 17-19.
- Warner, T.D., Giuliano, F., Vojnović, I., Bukasa, A., Mitchell, J.A., Vane, J.R. (1999): Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: A full *in vitro* analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 7563–7568.
- Werz, O., Steinhilber, D. (2005): Development of 5-lipoxygenase inhibitors-lessons from cellular enzyme regulation. *Biochem. Pharmacol.* **70**: 327-333.
- Westerhof, W., Das, P.K., Middelkoop, E., Verschoor, J., Storey, L., Regnier, C. (2001): Mucopolysaccharides from psyllium involved in wound healing. *Drugs Exp. Clin. Res.* **27**: 165-175.
- WHO. *World Health Organization Monographs on Selected Medicinal Plants*, vol. 1. WHO, Geneva, Switzerland, 1999. 202-212.
- Wichtl, M. (1994): Herbal drugs and phytopharmaceuticals. Medpharm, Stuttgart, Germany. 378-382.



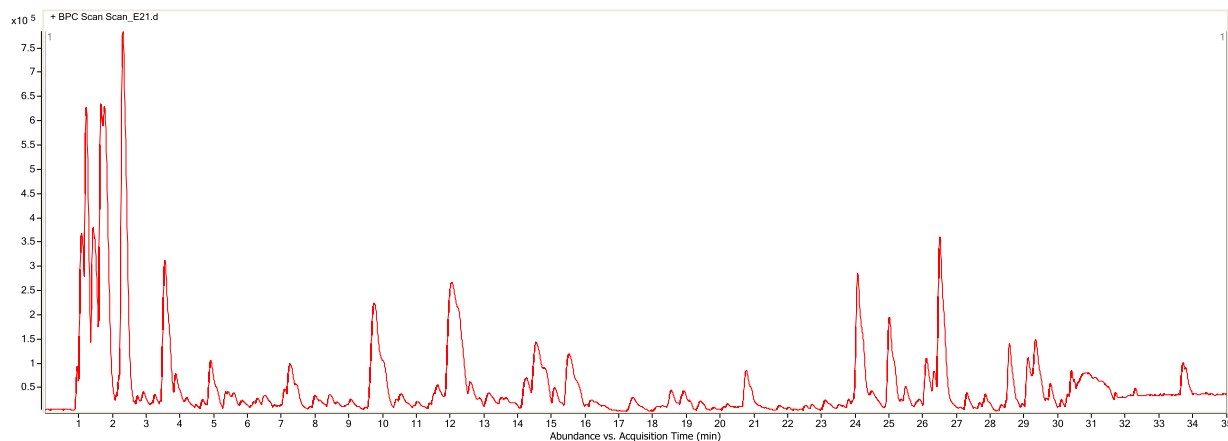
- Wong, S.H., Knight, J.A., Hopfer S.M., Zaharia, O., Leach, C.N., Sunderman, F.W. (1987): Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatography separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin. Chem.* **33**: 214-220.
- Woods, W.J., Evans, F.J., Ethier, D., Scott, S., Vickers, P.J., Hearn, L., Heibin, J.A., Charleson, S., Singer, I.I. (1993): 5-Lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein are localized in the nuclear envelope of activated human leukocytes. *J. Exp. Med.* **178**: 1935-1946.
- You, K.M., Jong, H.G., Kim, H.P. (1999): Inhibition of cyclooxygenase/lipoxygenase from human platelets by polyhydroxylated/methoxylated flavonoids isolated from medicinal plants. *Arch. Pharm. Res.* **22**: 18-24.
- Young, J.M., Panah, S., Satchawatcharaphong, C., Cheung, P.S. (1996): Human whole blood assays for inhibition of prostaglandin G/H synthases-1 and -2 using A23187 and lipopolysaccharide stimulation of thromboxane B<sub>2</sub> production. *Inflamm. Res.* **45**: 246-253.
- Young, R.N. (1999): Inhibitors of 5-lipoxygenase: a therapeutic potential yet to be fully realized? *Eur. J. Med. Chem.* **34**: 671-685.
- Zhang, F., Altorki, N.K., Mestre, J.R., Subbaramaiah, K., Dannenberg, A.J. (1999): Curcumin inhibits cyclooxygenase-2 transcription in bile acid- and phorbol ester-treated human gastrointestinal epithelial cells. *Carcinogenesis*, **20**: 445-451.
- [www.3dchem.com/molecules.asp?ID=111#](http://www.3dchem.com/molecules.asp?ID=111#)
- [www.botanik.uni-karlsruhe.de/garten/fotoshassler/Plantago%20argentea%20BotKA%20F1.jpg](http://www.botanik.uni-karlsruhe.de/garten/fotoshassler/Plantago%20argentea%20BotKA%20F1.jpg)
- [www.carl-roth.de](http://www.carl-roth.de)
- [www.dkfz.de/spec/lox-db/images/rb15-lox.jpg](http://www.dkfz.de/spec/lox-db/images/rb15-lox.jpg)
- [www.emedicine.com/med/TOPIC3096.HTM](http://www.emedicine.com/med/TOPIC3096.HTM)
- [www.en.wikipedia.org/wiki/Image:Cycloxygenase.gif](http://www.en.wikipedia.org/wiki/Image:Cycloxygenase.gif)
- [www.flickr.com/photos/digitplantimages/3581226870/](http://www.flickr.com/photos/digitplantimages/3581226870/)
- [www.gecco.org.chemie.uni-frankfurt.de/research.html](http://www.gecco.org.chemie.uni-frankfurt.de/research.html)
- [www.herba.msu.ru](http://www.herba.msu.ru)
- [www.karlsruhe.de/garten/fotoshassler/Plantago%20holostium%20SOE%20BotKA%20G6.jpg](http://www.karlsruhe.de/garten/fotoshassler/Plantago%20holostium%20SOE%20BotKA%20G6.jpg)
- [www.media.photobucket.com/image/plantago%20maritima/Syl2000/Flora%20-%20Flowers%20S-Y/SeaPlantain-Plantagomaritima.jpg](http://www.media.photobucket.com/image/plantago%20maritima/Syl2000/Flora%20-%20Flowers%20S-Y/SeaPlantain-Plantagomaritima.jpg)

- [www.nbti.org.rs/cms/view.php?id=136](http://www.nbti.org.rs/cms/view.php?id=136)
- [www.netterimages.com/image/11131.htm](http://www.netterimages.com/image/11131.htm)
- [www.nextpharmaceuticals.com](http://www.nextpharmaceuticals.com)
- [www.nyf.hu/others/html/kornyezettud/mm/kornytud/termved/tgy2/plasch1.jpg](http://www.nyf.hu/others/html/kornyezettud/mm/kornytud/termved/tgy2/plasch1.jpg)
- [www.pharm1.pharmazie.uni-greifswald.de/systematik/7\\_bilder/coolpix/Ma020342.jpg](http://www.pharm1.pharmazie.uni-greifswald.de/systematik/7_bilder/coolpix/Ma020342.jpg)
- [www.s3.amazonaws.com/lcp/myrtus/myfiles/Plantago-lanceolata1.jpg](http://www.s3.amazonaws.com/lcp/myrtus/myfiles/Plantago-lanceolata1.jpg)
- [www.sgc.ki.se/structures.html](http://www.sgc.ki.se/structures.html)
- [www.sophy.u-3mrs.fr/Photo-cp/Pic/Plantago\\_bellardii\\_27\\_04\\_2003\\_1.JPG](http://www.sophy.u-3mrs.fr/Photo-cp/Pic/Plantago_bellardii_27_04_2003_1.JPG)
- [www.static.panoramio.com/photos/original/1673396.jpg](http://www.static.panoramio.com/photos/original/1673396.jpg)
- [www.wnmu.edu/academic/nspages2/gilaflorea/plantago\\_major.jpg](http://www.wnmu.edu/academic/nspages2/gilaflorea/plantago_major.jpg)
- [www.y.delfi.lv/norm/32404/712738\\_kD0y6F.jpeg](http://www.y.delfi.lv/norm/32404/712738_kD0y6F.jpeg)

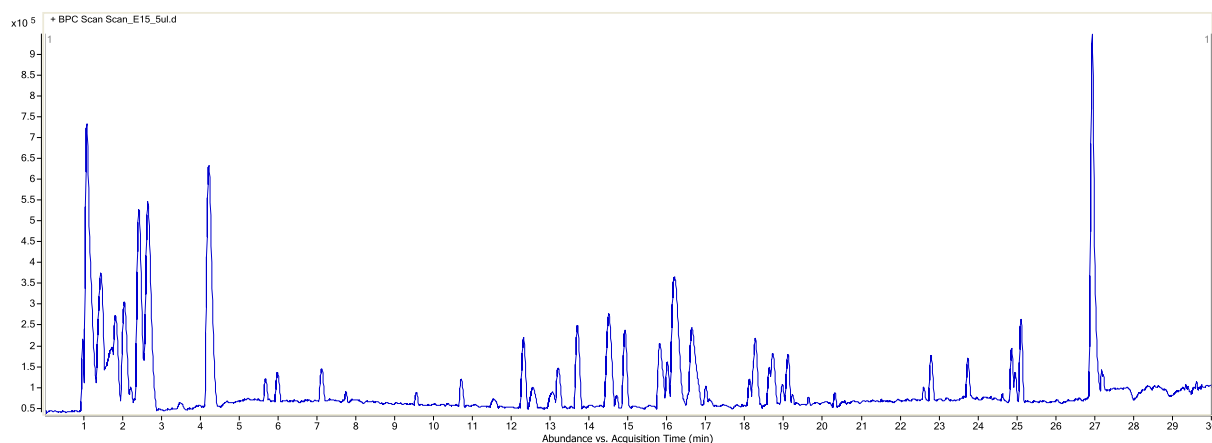
## 8. PRILOG

### 8.1. LC-MS/MS analiza

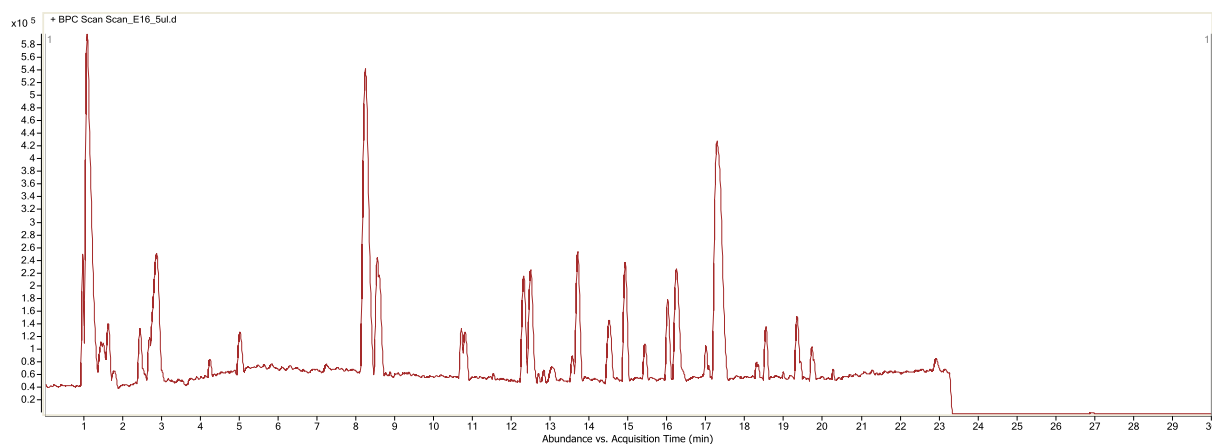
#### 8.1.1. HPLC-MS hromatogrami ispitivanih ekstrakata - Scan mod



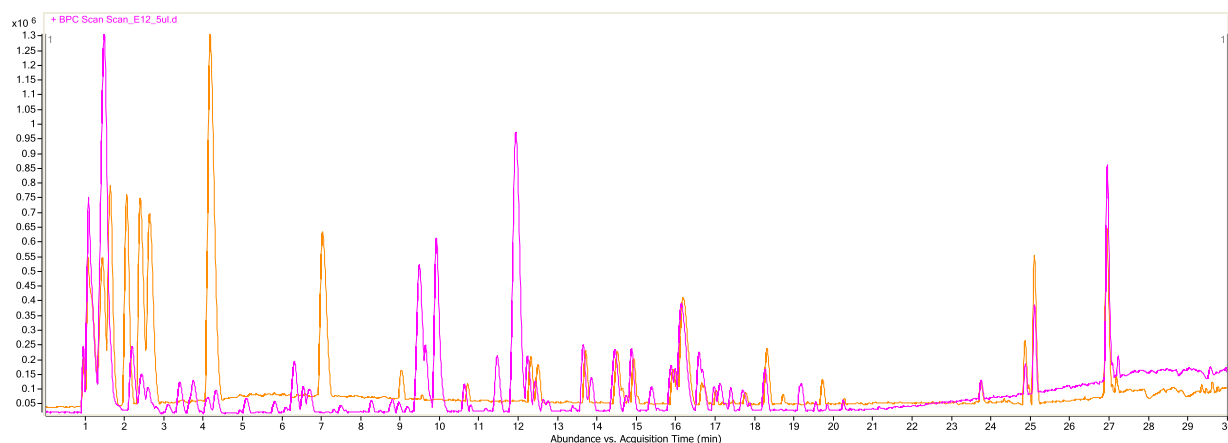
Slika 8.1. HPLC-MS hromatogram *P. altissima*, Novi Sad



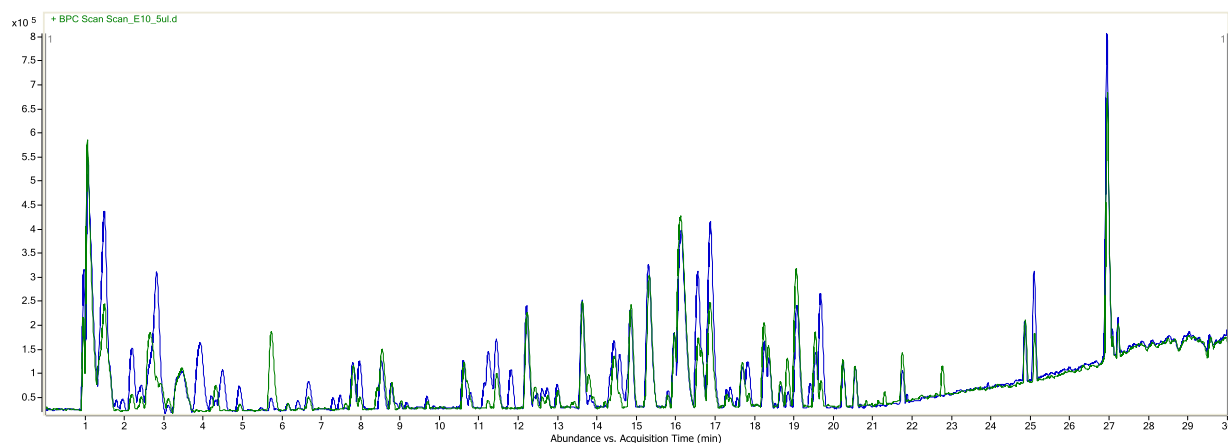
Slika 8.2. HPLC-MS hromatogram *P. argentea*, Rtanj



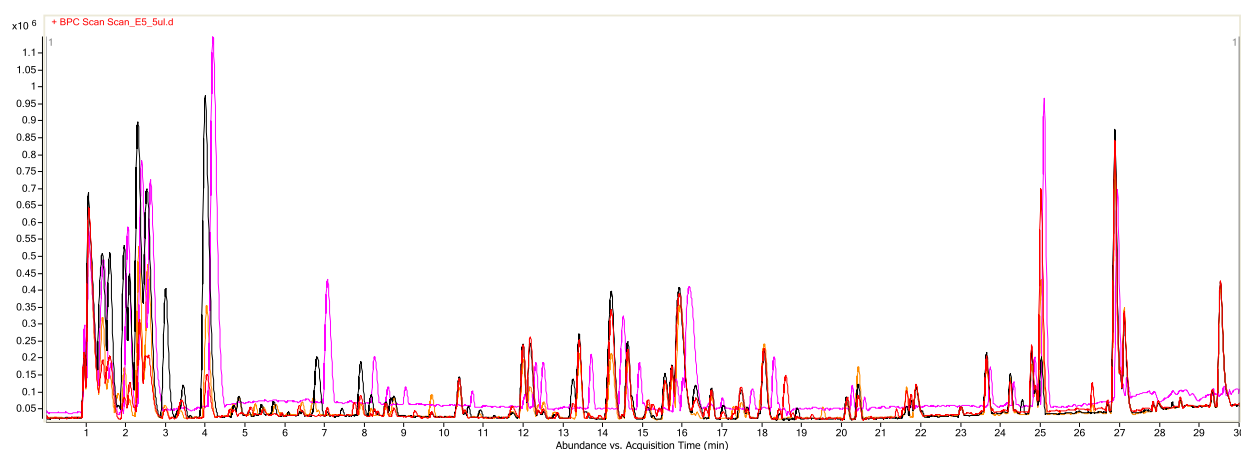
Slika 8.3. HPLC-MS hromatogram *P. bellardii*, Ulcinj



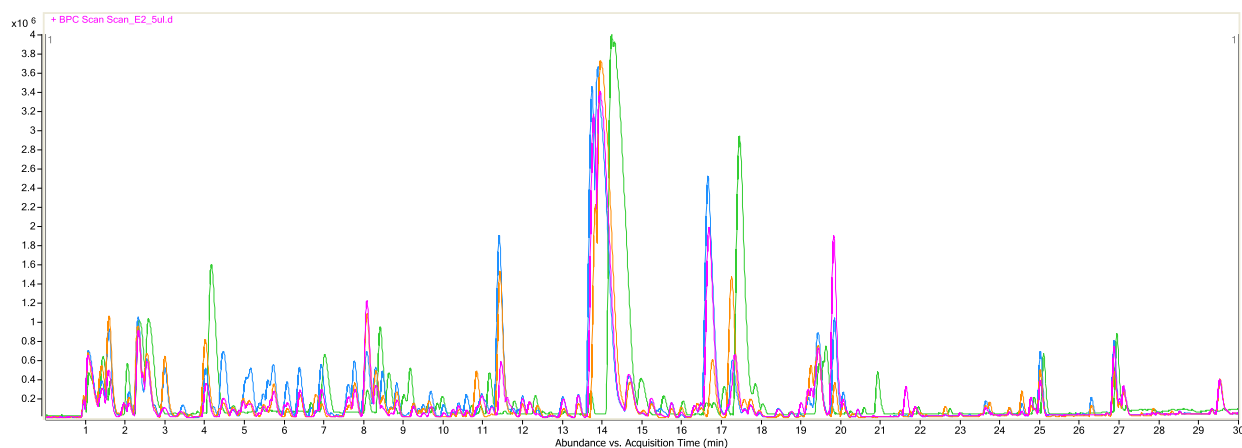
Slika 8.4. HPLC-MS hromatogram *P. coronopus*, Čanj (narandžasto) i *P. coronopus*, Čanj (ružičasto)



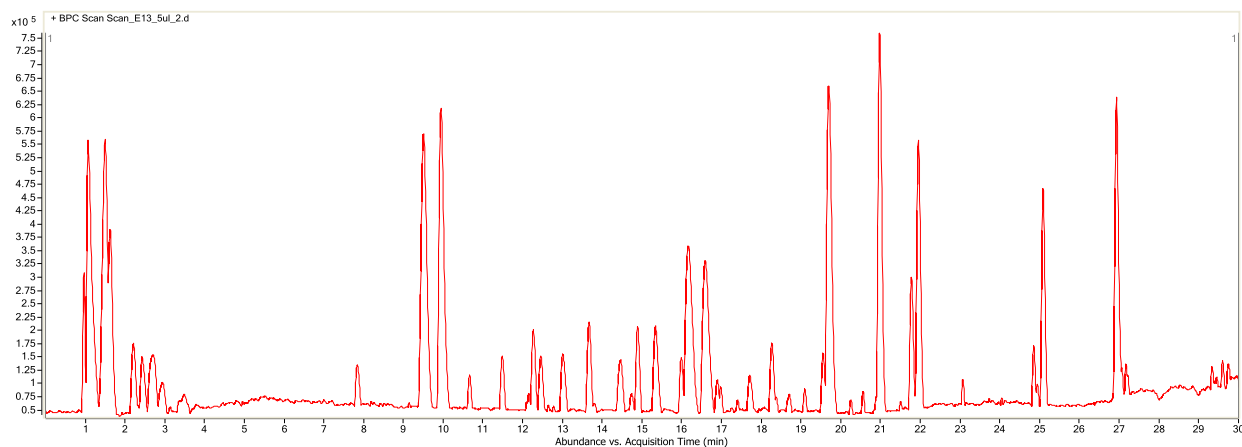
Slika 8.5. HPLC-MS hromatogram *P. holosteum*, Dimitrovgrad (zeleno) i *P. holosteum*, Niš (plavo)



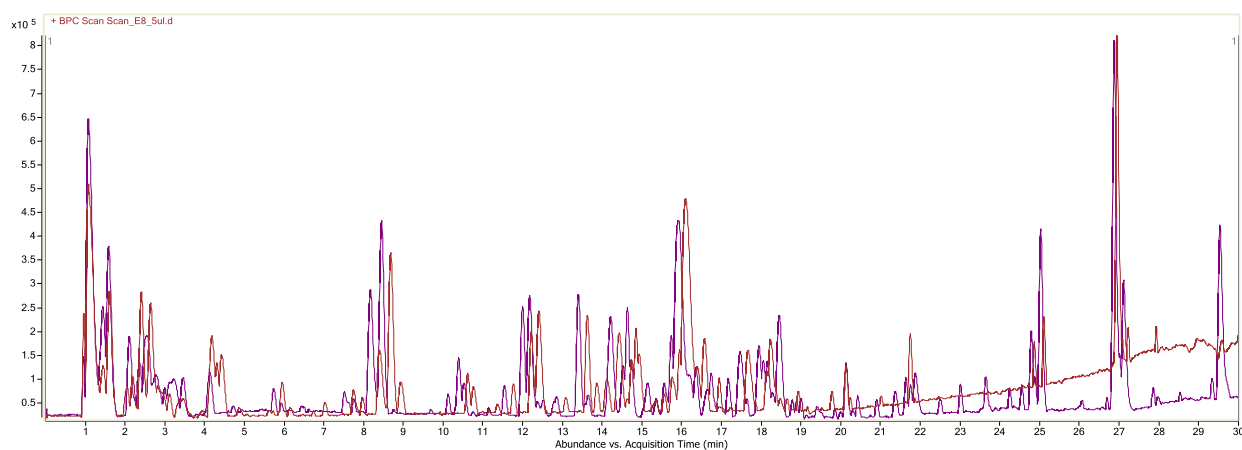
Slika 8.6. HPLC-MS hromatogram *P. lanceolata*, Bar (narandžasto), *P. lanceolata*, Fruška gora (ružičasto), *P. lanceolata*, Kopaonik (crno) i *P. lanceolata*, Zlatar (crveno)



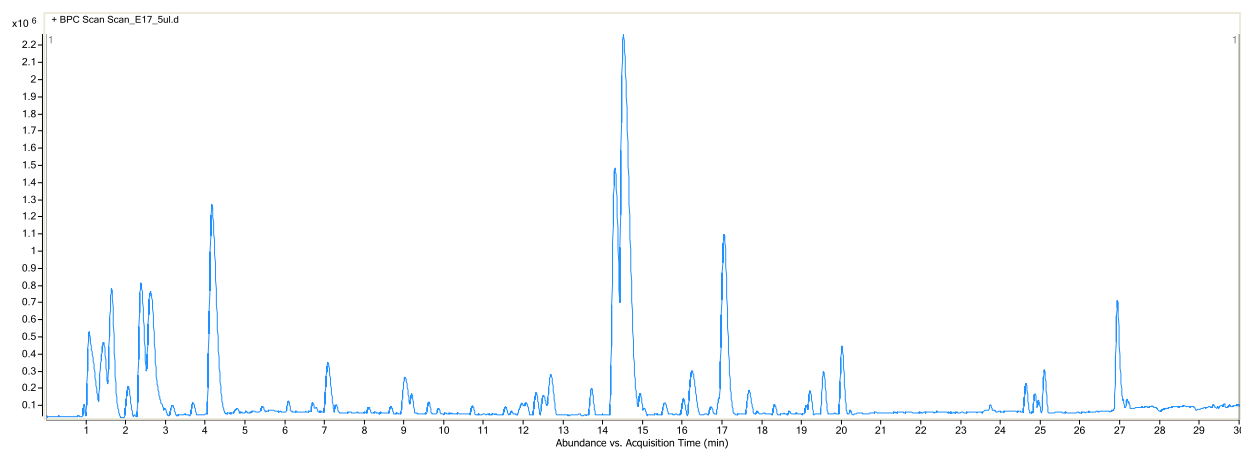
Slika 8.7. HPLC-MS hromatogram *P. major*, Fruška gora (zeleno), *P. major*, Kopaonik (plavo), *P. major*, Novi Sad (narandžasto) i *P. major*, Zlatar (ružičasto)



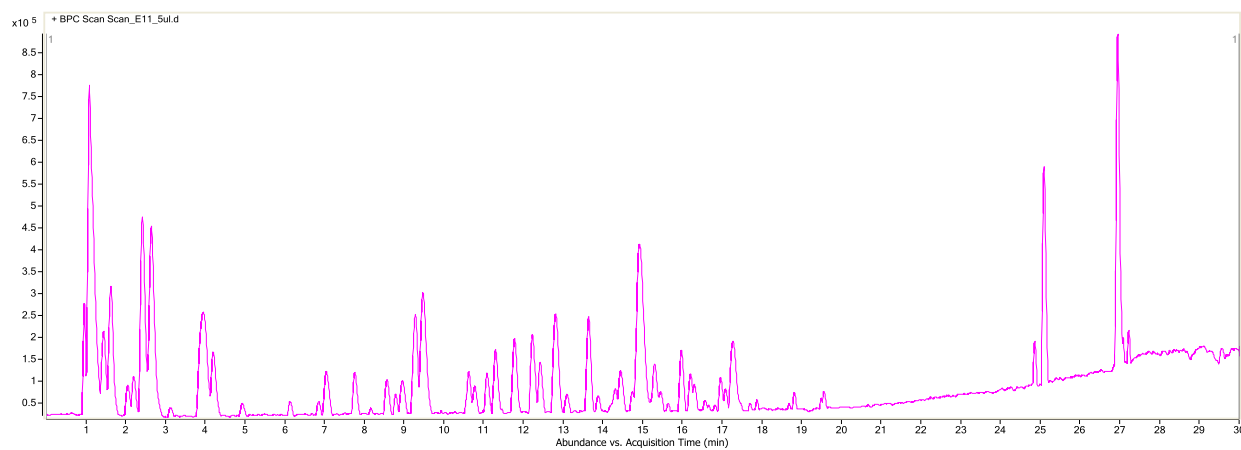
Slika 8.8. HPLC-MS hromatogram *P. maritima*, Padej



Slika 8.9. HPLC-MS hromatogram *P. media*, Kopaonik (ljubičasto) i *P. media*, Zlatar (braon)



Slika 8.10. HPLC-MS hromatogram *P. reniformis*, Vizitor

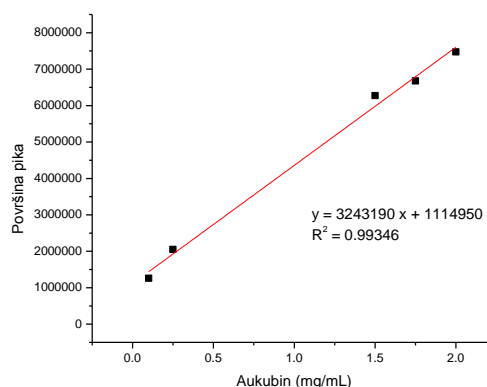


Slika 8.11. HPLC-MS hromatogram *P. schwarzenbergiana*, Padej

### 8.1.2. Kvantitativni sadržaj aukubina

Tabela 8.1. Kalibraciona kriva  
(aukubin)

Koncentracija aukubina (mg/mL)	Površina pika
0.10	1260960
0.25	2052180
1.50	6271000
1.75	6678110
2.00	7474370



Grafik 8.1. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja aukubina u ispitivanim ekstraktima: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije aukubina

Tabela 8.2. Sadržaj aukubina u ispitivanim ekstraktima

injektovano 5 μl ekstrakta koncentracije 0.02 mg/mL	Očitana površina pika			Određena koncentracija aukubina (mg/mL)			Sadržaj aukubina (mg/g suvog ekstrakta)			
	P-1	P-2	P-3	C-1	C-2	C-3	Srednja vrednost ±SD			
<i>P. altissima</i> , Novi Sad	3113620	2897241	2809831	0.62	0.55	0.52	30.81	27.48	26.13	28.14±2.41
<i>P. argentea</i> , Rtanj	1810026	1766396	1472859	0.21	0.20	0.11	10.72	10.04	5.52	10.38±0.48
<i>P. bellardii</i> , Ulcinj	400863	396514	345370	<0.1	<0.1	<0.1	<5.0	<5.0	<5.0	<5.0
<i>P. coronopus</i> , Čanj	1116857	1007545	947541	<0.1	<0.1	<0.1	<5.0	<5.0	<5.0	<5.0
<i>P. coronopus</i> , Niš	1036945	869940	638417	<0.1	<0.1	<0.1	<5.0	<5.0	<5.0	<5.0
<i>P. holosteam</i> , Dimitrovgrad	5318797	5090400	4199561	1.30	1.23	0.95	64.81	61.29	47.56	63.05±2.49
<i>P. holosteam</i> , Kopaonik	2623392	2567089	1936769	0.47	0.45	0.25	23.26	22.39	12.67	22.82±0.61
<i>P. lanceolata</i> , Bar	3247576	2914134	2553692	0.66	0.55	0.44	32.88	27.74	22.18	30.31±3.63
<i>P. lanceolata</i> , Fruška gora	4734642	4582421	4210365	1.12	1.07	0.95	55.80	53.46	47.72	54.63±1.66
<i>P. lanceolata</i> , Kopaonik	4538577	4390517	4259789	1.06	1.01	0.97	52.78	50.50	48.48	50.59±2.15
<i>P. lanceolata</i> , Zlatar	5071811	4979121	4691222	1.22	1.19	1.10	61.00	59.57	55.14	58.57±3.06
<i>P. major</i> , Fruška gora	645495	546212	-	<0.1	<0.1	-	<5.0	<5.0	<5.0	<5.0
<i>P. major</i> , Kopaonik	2439342	2359284	2278916	0.41	0.38	0.36	20.42	19.18	17.94	19.18±1.24

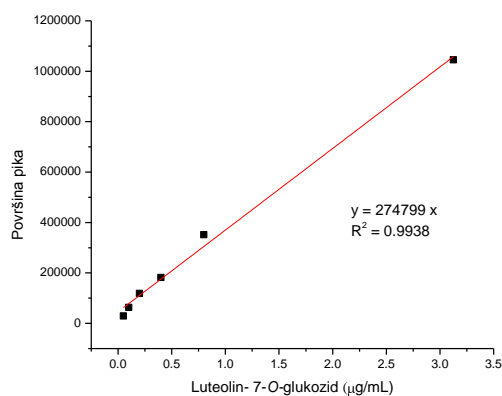
<i>P. major</i> , Novi Sad	1319388	1060995	1016911	<0.1	<0.1	<0.1	<5.0	<5.0	<5.0	<5.0
<i>P. major</i> , Zlatar	3113420	2797241	2709831	0.62	0.52	0.49		25.94	24.59	25.26±0.95
<i>P. maritima</i> , Padej		3292924	2806615	<0.1	0.67	0.52	30.81	33.58	26.08	29.83±5.30
<i>P. media</i> , Kopaonik	5489215	5159045	4812790	1.35	1.25	1.14	67.44	62.35	57.01	62.26±5.21
<i>P. media</i> , Zlatar	3992871	3738609	3336249	0.89	0.81	0.68	44.37	40.45	34.25	42.41±2.77
<i>P. reniformis</i> , Vizitor	1165224	1131228	1040516	<0.1	<0.1	<0.1	<5.0	<5.0	<5.0	<5.0
<i>P. schwarzenbe.</i> , Padej	3497669	3151376	2458383	0.73	0.63	0.41	36.73	31.40	20.71	34.06±3.78

### 8.1.3. Kvantitativni sadržaj odabranih flavonoida

#### a) Luteolin-7-O-glukozid

Tabela 8.3. Kalibraciona kriva  
(luteolin-7-O-glukozid)

Koncentracija luteolin-7-O- glukozida (µg/mL)	Površina pika
0.050	29132
0.100	63527
0.200	118720
0.400	182216
0.800	351800
3.125	1045550



Grafik 8.2. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja luteolin-7-O-glukozida u ispitivanim ekstraktima: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije luteolin-7-O-glukozida



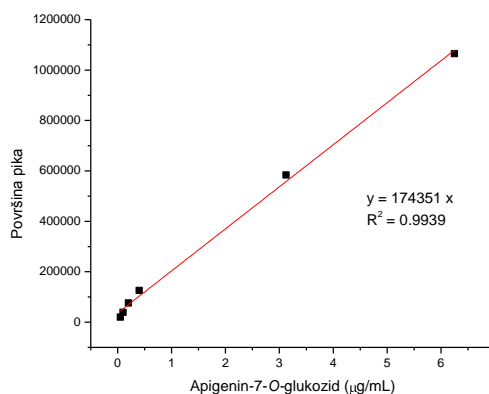
Tabela 8.4. Sadržaj luteolin-7-O-glukozi u ispitivanim ekstraktima

injektovano 5 $\mu$ l ekstrakta koncentracije 0.02 mg/mL	Očitana površina pika			Određena koncentracija luteolin-7-O- glukozi (μg/mL)			Sadržaj luteolin-7-O-glukozi (μg/g suvog ekstrakta)			
	P-1	P-2	P-3	C-1	C-2	C-3	Srednja vrednost $\pm$ SD			
<i>P. altissima</i> , Novi Sad	174481	169322	169322	0.63	0.62	0.62	31.75	30.81	30.81	31.12 $\pm$ 0.54
<i>P. argentea</i> , Rtanj	438894	441235	440085	1.60	1.61	1.60	79.86	80.28	80.07	80.07 $\pm$ 0.21
<i>P. bellardii</i> , Ulcinj	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. coronopus</i> , Čanj	67847	68385	68198	0.25	0.25	0.25	12.34	12.44	12.41	12.40 $\pm$ 0.05
<i>P. coronopus</i> , Niš	194253	193435	193495	0.71	0.70	0.70	35.34	35.20	35.21	35.25 $\pm$ 0.08
<i>P. holostium</i> , Dimitrovgrad	487871	466186	449665	1.78	1.70	1.64	88.77	84.82	81.82	85.14 $\pm$ 3.49
<i>P. holostium</i> , Kopaonik	830734	833823	829456	3.02	3.03	3.02	151.15	151.72	150.92	151.26 $\pm$ 0.41
<i>P. lanceolata</i> , Bar	8961	7814	8034	0.03	0.03	0.03	1.63	1.42	1.46	1.50 $\pm$ 0.11
<i>P. lanceolata</i> , Fruška gora	35299	35623	35501	0.13	0.13	0.13	6.42	6.48	6.46	6.45 $\pm$ 0.03
<i>P. lanceolata</i> , Kopaonik	109452	-	111324	0.40	-	0.41	19.91	-	20.26	20.08 $\pm$ 0.24
<i>P. lanceolata</i> , Zlatar	201902	203199	204333	0.73	0.74	0.74	36.74	36.97	37.18	36.96 $\pm$ 0.22
<i>P. major</i> , Fruška gora	1201045	1172544	1147850	4.37	4.27	4.18	218.53	213.35	208.85	213.58 $\pm$ 4.84
<i>P. major</i> , Kopaonik	200149	198972	199916	0.73	0.72	0.73	36.42	36.20	36.37	36.33 $\pm$ 0.11
<i>P. major</i> , Novi Sad	1083288	987142	948198	3.94	3.59	3.45	197.11	179.61	172.53	183.08 $\pm$ 12.65
<i>P. major</i> , Zlatar	594333	588766	586020	2.16	2.14	2.13	108.14	107.13	106.63	107.30 $\pm$ 0.77
<i>P. maritima</i> , Padej	80383	78623	80693	0.29	0.29	0.29	14.63	14.31	14.68	14.54 $\pm$ 0.20
<i>P. media</i> , Kopaonik	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. media</i> , Zlatar	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. reniformis</i> , Vizitor	7621	8065	6257	0.03	0.03	0.02	1.39	1.47	1.14	1.33 $\pm$ 0.17
<i>P. schwarzenberg.</i> , Padej	11180	11356	11050	0.04	0.04	0.04	2.03	2.07	2.01	2.04 $\pm$ 0.03

## b) Apigenin-7-O-glukozid

Tabela 8.5. Kalibraciona kriva  
(apigenin-7-O-glukozid)

Koncentracija apigenin-7-O- glukozida ( $\mu\text{g/mL}$ )	Površina pika
0.05	19795
0.100	38846
0.200	76192
0.400	125509
3.125	583950
6.250	1064830



Grafik 8.3. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja apigenin-7-O-glukozida u ispitivanim ekstraktima: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije apigenin-7-O-glukozida

Tabela 8.6. Sadržaj apigenin-7-O-glukozida u ispitivanim ekstraktima

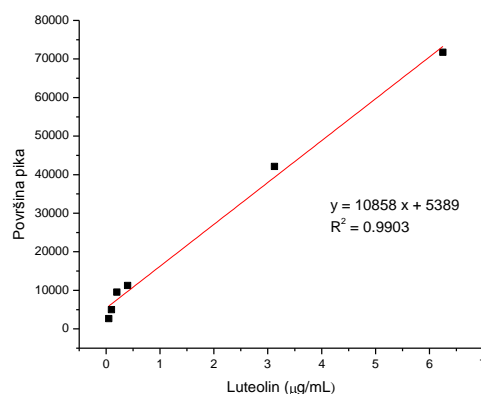
injektovano 5 $\mu\text{L}$ ekstrakta koncentracije 0.02 mg/mL	Očitana površina pika			Određena koncentracija apigenin-7-O- glukozida ( $\mu\text{g/mL}$ )			Sadržaj apigenin-7-O-glukozida ( $\mu\text{g/g}$ suvog ekstrakta)			
	P-1	P-2	P-3	C-1	C-2	C-3	Srednja vrednost $\pm\text{SD}$			
<i>P. altissima</i> , Novi Sad	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. argentea</i> , Rtanj	409931	411590	410439	2.35	2.36	2.35	117.56	118.03	117.70	117.77 $\pm$ 0.24
<i>P. bellardii</i> , Ulcinj	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. coronopus</i> , Čanj	10650	10534	10453	0.06	0.06	0.06	3.05	3.02	3.00	3.02 $\pm$ 0.03
<i>P. coronopus</i> , Niš	12814	12810	12961	0.07	0.07	0.07	3.67	3.67	3.72	3.69 $\pm$ 0.02
<i>P. holosteum</i> , Dimitrovgrad	67274	64376	62091	0.39	0.37	0.36	19.29	18.46	17.81	18.52 $\pm$ 0.74
<i>P. holosteum</i> , Kopaonik	96189	100227	100323	0.55	0.57	0.58	27.58	28.74	28.77	28.37 $\pm$ 0.68
<i>P. lanceolata</i> , Bar	3660	3313	3150	0.02	0.02	0.02	1.05	0.95	0.90	0.97 $\pm$ 0.07
<i>P. lanceolata</i> , Fruška gora	2301	1696	1749	0.01	0.01	0.01	0.66	0.49	0.50	0.55 $\pm$ 0.10
<i>P. lanceolata</i> , Kopaonik	5809	6030	5224	0.03	0.03	0.03	1.67	1.73	1.50	1.63 $\pm$ 0.12
<i>P. lanceolata</i> , Zlatar	14296	14102	14161	0.08	0.08	0.08	4.10	4.04	4.06	4.07 $\pm$ 0.03
<i>P. major</i> ,	53420	44285	41226	0.31	0.25	0.24	15.32	12.70	11.82	13.28 $\pm$ 1.82

Novi Sad										
<i>P. major</i> , Fruška gora	27684	26614	25845	0.16	0.15	0.15	7.94	7.63	7.41	7.66±0.26
<i>P. major</i> , Kopaonik	11965	11916	11969	0.07	0.07	0.07	3.43	3.42	3.43	3.43±0.01
<i>P. major</i> , Zlatar	31687	31150	31039	0.18	0.18	0.18	9.09	8.93	8.90	8.97±0.10
<i>P. maritima</i> , Padej	2712	2988	2703	0.02	0.02	0.02	0.78	0.86	0.78	0.80±0.05
<i>P. media</i> , Zlatar	16144	15998	15521	0.09	0.09	0.09	4.63	4.59	4.45	4.56±0.09
<i>P. media</i> , Kopaonik	34138	34245	34168	0.20	0.20	0.20	9.79	9.82	9.80	9.80±0.02
<i>P. reniformis</i> , Vizitor	6559	6446	6354	0.04	0.04	0.04	1.88	1.85	1.82	1.85±0.03
<i>P. schwarzenberg</i> , Padej	104484	102456	100323	0.60	0.59	0.58	29.96	29.38	28.77	29.37±0.60

### c) Luteolin

Tabela 8.7. Kalibraciona kriva (luteolin)

Koncentracija luteolina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Površina pika
0.050	2657
0.100	4978
0.200	9526
0.400	11244
3.125	42136
6.250	71737



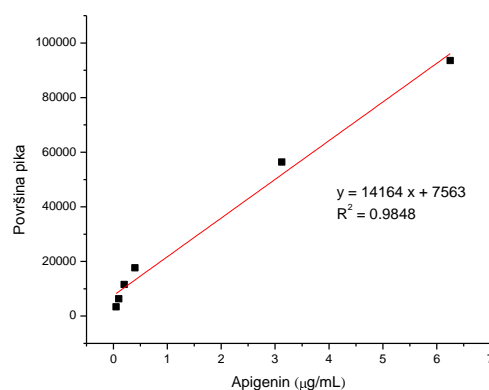
Grafik 8.4. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja luteolina u ispitivanim ekstraktima: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije luteolina

Tabela 8.8. Sadržaj luteolina u ispitivanim ekstraktima

injektovano 5 $\mu$ l ekstrakta koncentracije 0.02 mg/mL	Očitana površina pika			Određena koncentracija luteolina ( $\mu$ g/mL)			Sadržaj luteolina ( $\mu$ g/g suvog ekstrakta)			
	P-1	P-2	P-3	C-1	C-2	C-3	Srednja vrednost $\pm$ SD			
<i>P. altissima</i> , Novi Sad	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. argentea</i> , Rtanj	32730	31978	30339	2.52	2.45	2.30	125.90	122.44	114.89	121.08 $\pm$ 5.63
<i>P. bellardii</i> , Ulcinj	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. coronopus</i> , Čanj	1333	1425	1166	<0.05	<0.05	<0.05	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5
<i>P. coronopus</i> , Niš	2980	3088	2780	<0.05	<0.05	<0.05	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5
<i>P. holosteum</i> , Dimitrovgrad	10025	9657	9475	0.43	0.39	0.38	21.35	19.65	18.82	19.94 $\pm$ 1.29
<i>P. holosteum</i> , Kopaonik	16719	16642	17098	1.04	1.04	1.08	52.17	51.82	53.92	52.64 $\pm$ 1.12
<i>P. lanceolata</i> , Bar	1998	947	1127	<0.05	<0.05	<0.05	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5
<i>P. lanceolata</i> , Fruška gora	4899	4283	4385	<0.05	<0.05	<0.05	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5
<i>P. lanceolata</i> , Kopaonik	6253	6248	6200	0.08	0.08	0.07	3.98	3.96	3.73	3.89 $\pm$ 0.13
<i>P. lanceolata</i> , Zlatar	12126	11856	11617	0.62	0.60	0.57	31.02	29.78	28.68	29.83 $\pm$ 1.17
<i>P. major</i> , Fruška gora	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. major</i> , Kopaonik	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. major</i> , Novi Sad	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. major</i> , Zlatar	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. maritima</i> , Padej	27091	27086	27191	2.00	2.00	2.01	99.94	99.91	100.40	100.08 $\pm$ 0.27
<i>P. media</i> , Kopaonik	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. media</i> , Zlatar	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. reniformis</i> , Vizitor	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. schwarzenberg</i> , Padej	2413	2447	2470	<0.05	<0.05	<0.05	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5

**d) Apigenin****Tabela 8.9.** Kalibraciona kriva (apigenin)

Koncentracija apigenina (µg/mL)	Površina pika
0.05	3354
0.100	6300
0.200	11557
0.400	17625
3.125	56386
6.250	93577

**Grafik 8.5.** Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja apigenina u ispitivanim ekstraktima: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije apigenina**Tabela 8.10.** Sadržaj apigenina u ispitivanim ekstraktima

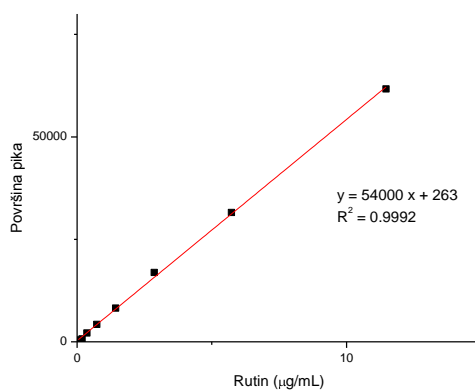
injektovano 5 µl ekstrakta koncentracije 0.02 mg/mL	Očitana površina pika			Određena koncentracija apigenina (µg/mL)			Sadržaj apigenina (µg/g suvog ekstrakta)			
	P-1	P-2	P-3	C-1	C-2	C-3				Srednja vrednost ±SD
<i>P. altissima</i> , Novi Sad	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. argentea</i> , Rtanj	14851	14960	14968	0.51	0.52	0.52	25.73	26.11	26.14	25.99±0.23
<i>P. bellardii</i> , Ulcinj	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. coronopus</i> , Čanj	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. coronopus</i> , Niš	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. holosteam</i> , Dimitrovgrad	740	403	366	<0.05	<0.05	<0.05	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5
<i>P. holosteam</i> , Kopaonik	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. lanceolata</i> , Bar	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. lanceolata</i> , Fruška gora	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. lanceolata</i> , Kopaonik	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. lanceolata</i> , Zlatar	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. major</i> , Fruška gora	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

<i>P. major</i> , Kopaonik	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. major</i> , Novi Sad	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. major</i> , Zlatar	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. maritima</i> , Padej	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. media</i> , Kopaonik	4901	5402	3815	<0.05	<0.05	<0.05	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5
<i>P. media</i> , Zlatar	828	286	342	<0.05	<0.05	<0.05	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5
<i>P. reniformis</i> , Vizitor	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. schwarzenberg</i> , Padej	7713	7751	7729	<0.05	<0.05	<0.05	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5

### e) Rutin

Tabela 8.11. Kalibraciona kriva  
(rutin)

Koncentracija rutina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Površina pika
0.183	718
0.367	2130
0.734	4226
1.431	8231
2.867	16920
5.734	31566
11.468	61714



Grafik 8.6. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja rutina u ispitivanim ekstraktima: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije rutina

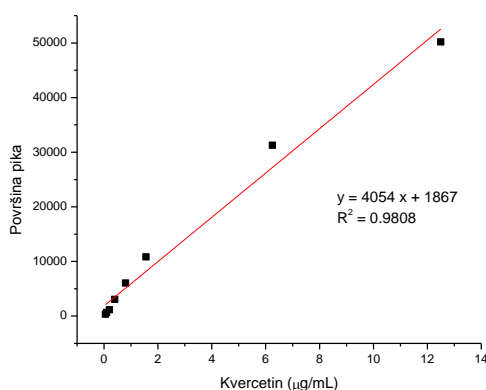
Tabela 8.12. Sadržaj rutina u ispitivanim ekstraktima

injektovano 5 $\mu$ l ekstrakta koncentracije 0.02 mg/mL	Očitana površina pika			Određena koncentracija rutina ( $\mu$ g/mL)			Sadržaj rutina ( $\mu$ g/g suvog ekstrakta)			
	P-1	P-2	P-3	C-1	C-2	C-3	Srednja vrednost $\pm$ SD			
<i>P. altissima</i> , Novi Sad	26	41	-	<0.001	<0.001	-	<0.05	<0.05	-	<0.05
<i>P. argentea</i> , Rtanj	1747	1961	2114	0.027	0.031	0.034	1.37	1.57	1.71	1.55 $\pm$ 0.17
<i>P. bellardii</i> , Ulcinj	450037	489706	501328	8.329	9.064	9.279	416.46	453.19	463.95	444.53 $\pm$ 24.90
<i>P. coronopus</i> , Čanj	864	965	841	0.011	0.013	0.011	0.56	0.65	0.54	0.58 $\pm$ 0.06
<i>P. coronopus</i> , Niš	63	57	62	<0.001	<0.001	<0.001	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
<i>P. holosteuum</i> , Dimitrovgrad	246	216	230	<0.001	<0.001	<0.001	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
<i>P. holosteuum</i> , Kopaonik	174	100	148	<0.001	<0.001	<0.001	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
<i>P. lanceolata</i> , Bar	1265	1115	1206	0.019	0.016	0.017	0.93	0.79	0.87	0.86 $\pm$ 0.07
<i>P. lanceolata</i> , Fruška gora	822	910	814	0.010	0.012	0.010	0.52	0.60	0.51	0.54 $\pm$ 0.05
<i>P. lanceolata</i> , Kopaonik	2567	2288	2142	0.043	0.038	0.035	2.13	1.88	1.74	1.92 $\pm$ 0.20
<i>P. lanceolata</i> , Zlatar	968	894	795	0.013	0.012	0.010	0.65	0.58	0.49	0.58 $\pm$ 0.08
<i>P. major</i> , Fruška gora	1095	1251	1052	0.015	0.018	0.015	0.77	0.91	0.73	0.81 $\pm$ 0.10
<i>P. major</i> , Kopaonik	555	587	532	0.005	0.006	0.005	0.27	0.30	0.25	0.27 $\pm$ 0.03
<i>P. major</i> , Novi Sad	231	199	176	<0.001	<0.001	<0.001	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
<i>P. major</i> , Zlatar	471	462	443	0.004	0.004	0.003	0.19	0.18	0.17	0.18 $\pm$ 0.01
<i>P. maritima</i> , Padej	151	161	170	<0.001	<0.001	<0.001	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
<i>P. media</i> , Kopaonik	1099	953	940	0.015	0.013	0.013	0.77	0.64	0.63	0.68 $\pm$ 0.08
<i>P. media</i> , Zlatar	191	120	163	<0.001	<0.001	<0.001	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
<i>P. reniformis</i> , Vizitor	1109	1208	1069	0.016	0.018	0.015	0.78	0.88	0.75	0.80 $\pm$ 0.07
<i>P. schwarzenberg</i> , Padej	314	265	268	<0.001	<0.001	<0.001	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

## f) Kvercetin

Tabela 8.13. Kalibraciona kriva (kvercetin)

Koncentracija kvercetina (µg/mL)	Površina pika
0.050	336
0.100	664
0.200	1173
0.400	3059
0.800	6045
1.560	10835
6.250	31279
12.50	50177



Grafik 8.7. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja kvercetina u ispitivanim ekstraktima: funkcija zavisnosti površine pika od koncentracije kvercetina

Tabela 8.14. Sadržaj kvercetina u ispitivanim ekstraktima

injektovano 5 µl ekstrakta koncentracije 0.02 mg/mL	Očitana površina pika			Određena koncentracija kvercetina (µg/mL)			Sadržaj kvercetina (µg/g suvog ekstrakta)			
	P-1	P-2	P-3	C-1	C-2	C-3				Srednja vrednost ±SD
<i>P. altissima</i> , Novi Sad	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. argentea</i> , Rtanj	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. bellardii</i> , Ulcinj	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. coronopus</i> , Čanj	19	25	16	<0.05	<0.05	<0.05	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5
<i>P. coronopus</i> , Niš	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. holostium</i> , Dimitrovgrad	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. holostium</i> , Kopaonik	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. lanceolata</i> , Bar	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. lanceolata</i> , Fruška gora	13	15	15	<0.05	<0.05	<0.05	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5
<i>P. lanceolata</i> , Kopaonik	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. lanceolata</i> , Zlatar	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. major</i> ,	54	68	58	<0.05	<0.05	<0.05	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5



Fruška gora										
<i>P. major</i> , Kopaonik	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. major</i> , Novi Sad	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. major</i> , Zlatar	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. maritima</i> , Padej	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. media</i> , Kopaonik	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. media</i> , Zlatar	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. reniformis</i> , Vizitor	21	21	26	<0.05	<0.05	<0.05	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5
<i>P. schwarzenberg</i> , Padej	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

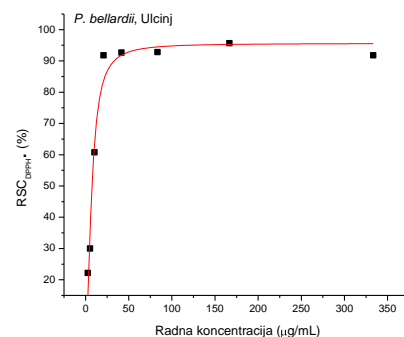
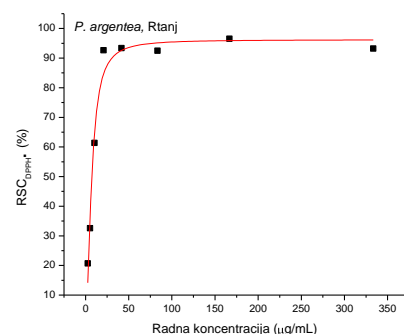
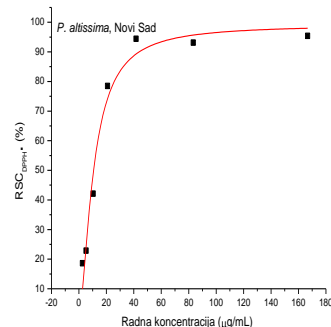
## 8.2. Antioksidantni potencijal

### 8.2.1. Neutralizacija DPPH<sup>•</sup> radikala

Tabela 8.15. Neutralizacija DPPH<sup>•</sup> radikala

(P. altissima, Novi Sad; P. argentea, Rtanj; P. bellardii, Ulcinj)

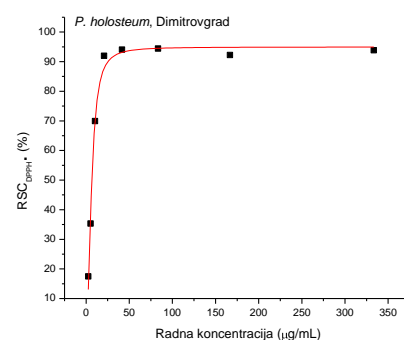
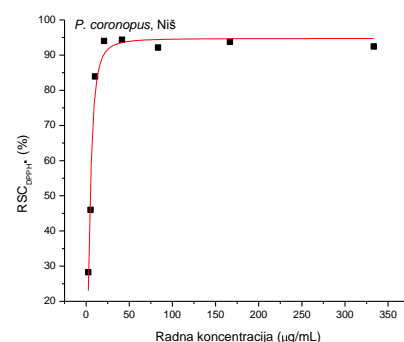
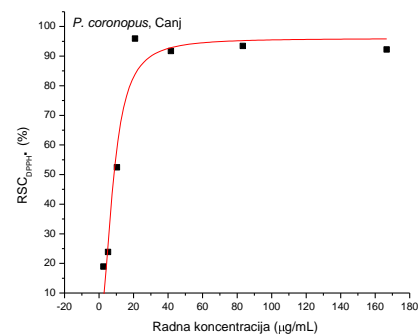
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC <sub>DPPH</sub> <sup>•</sup> (%)			
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	Srednja vrednost
<i>P. altissima</i> , Novi Sad								
2.60	0.294	0.299	0.342	0.038	23.86	22.33	9.64	18.61
5.21	0.295	0.312	0.315	0.047	26.41	21.50	20.63	22.85
10.42	0.227	0.244	0.264	0.050	47.49	42.34	36.52	42.12
20.83	0.081	0.118	0.146	0.043	88.60	77.61	69.28	78.50
41.67	0.062	0.057	0.060	0.041	93.71	95.16	94.33	94.40
83.33	0.067	0.076	0.070	0.048	94.37	91.58	93.43	93.13
166.67	0.065	0.066	0.064	0.050	95.40	95.17	95.59	95.39
Kontrola	0.396	0.372	0.367	0.041				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					9.99	10.63	11.59	10.74±0.81
<i>P. argentea</i> , Rtanj								
2.60	0.186	0.185	0.188	0.038	20.83	21.45	19.86	20.71
5.21	0.154	0.171	0.165	0.038	37.68	28.38	31.69	32.58
10.42	0.106	0.114	0.116	0.040	64.79	60.30	59.00	61.36
20.83	0.051	0.054	0.055	0.039	93.87	92.45	91.62	92.65
41.67	0.051	0.049	0.049	0.038	92.70	93.88	93.61	93.40
83.33	0.055	0.053	0.050	0.039	91.32	92.33	93.85	92.50
166.67	0.054	0.055	0.052	0.047	96.19	96.07	97.34	96.53
Kontrola	0.222	0.231	0.216	0.036				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					7.00	7.6.0	7.53	7.38±0.33
<i>P. bellardii</i> , Ulcinj								
2.60	0.197	0.187	0.189	0.046	19.13	24.42	22.97	22.17
5.21	0.171	0.163	0.171	0.038	28.67	32.95	28.39	30.00
10.42	0.123	0.103	0.114	0.040	55.67	66.16	60.40	60.75
20.83	0.057	0.053	0.053	0.039	90.39	92.53	92.37	91.76
41.67	0.051	0.050	0.051	0.037	92.43	92.83	92.78	92.68
83.33	0.050	0.050	0.054	0.038	93.49	93.56	91.33	92.79
166.67	0.054	0.052	0.053	0.045	95.04	96.09	95.85	95.66
333.33	0.063	0.056	0.056	0.043	88.97	93.25	93.18	91.80
Kontrola	0.222	0.231	0.216	0.036				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					7.45	7.01	7.51	7.32±0.27



Grafik 8.8. Zavisnost  
RSC<sub>DPPH<sup>•</sup></sub> - radna  
koncentracija ekstrakata  
*P. altissima*, Novi Sad  
*P. argentea*, Rtanj  
*P. bellardii*, Ulcinj

Tabela 8.16. Neutralizacija DPPH<sup>•</sup> radikala  
(*P. coronopus*, Čanj; *P. coronopus*, Niš; *P. holosteam*, Dimitrovgrad)

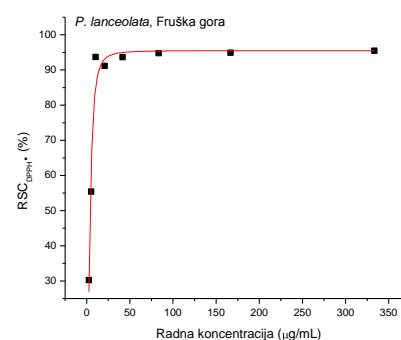
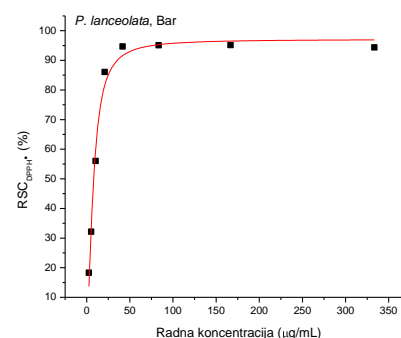
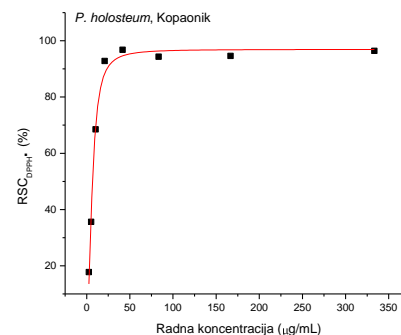
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC <sub>DPPH</sub> (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>P. coronopus</i> , Čanj								
2.60	0.208	0.207	0.212	0.056	19.54	20.00	17.30	18.95
5.20	0.183	0.192	0.197	0.047	28.06	22.99	20.50	23.85
10.40	0.134	0.132	0.139	0.045	53.04	53.90	50.34	52.42
20.83	0.064	0.063	0.061	0.055	95.30	95.74	96.67	95.90
41.67	0.067	0.055	0.058	0.044	87.93	94.24	92.98	91.72
83.33	0.057	0.058	0.058	0.045	93.66	93.17	93.40	93.41
166.67	0.059	0.062	0.059	0.045	92.91	91.15	92.61	92.22
Kontrola	0.222	0.231	0.216	0.036				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					8.20	8.54	8.51	8.42±0.19
<i>P. coronopus</i> , Niš								
2.60	0.203	0.189	0.189	0.203	23.56	30.57	30.59	28.24
5.21	0.166	0.130	0.146	0.166	36.25	54.92	46.78	45.98
10.42	0.089	0.073	0.073	0.089	78.31	86.82	86.57	83.90
20.83	0.058	0.055	0.059	0.058	93.60	95.35	93.04	93.99
41.67	0.058	0.057	0.057	0.058	93.85	94.67	94.54	94.35
83.33	0.060	0.062	0.060	0.060	92.24	91.55	92.61	92.13
166.67	0.064	0.062	0.061	0.064	92.97	93.84	94.49	93.77
333.33	0.064	0.070	0.066	0.064	93.74	90.78	92.76	92.43
Kontrola	0.23	0.228	0.229	0.036				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					5.88	4.23	4.65	4.44±0.30
<i>P. holosteam</i> , Dimitrovgrad								
2.60	0.208	0.215	0.210	0.042	19.01	15.67	17.69	17.46
5.20	0.173	0.171	0.181	0.043	36.29	37.45	32.18	35.31
10.40	0.108	0.103	0.117	0.048	70.50	72.96	66.32	69.93
20.83	0.058	0.061	0.056	0.042	92.17	90.69	93.02	91.96
41.67	0.055	0.056	0.056	0.043	94.13	93.92	94.05	94.03
83.33	0.058	0.056	0.058	0.046	94.28	94.89	94.09	94.42
166.67	0.059	0.071	0.058	0.047	94.00	88.24	94.50	92.25
333.33	0.061	0.061	0.062	0.049	93.90	94.15	93.52	93.86
Kontrola	0.253	0.245	0.221	0.036				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					6.46	6.35	7.03	6.61±0.37



Grafič 8.9. Zavisnost  
RSC<sub>DPPH<sup>•</sup></sub> - radna  
koncentracija ekstrakata  
*P. coronopus*, Čanj  
*P. coronopus*, Niš  
*P. holosteam*, Dimitrovgrad

Tabela 8.17. Neutralizacija DPPH<sup>•</sup> radikala  
(*P. holosteam*, Kopaonik; *P. lanceolata*, Bar; *P. lanceolata*, Fruška gora)

Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC <sub>DPPH</sub> <sup>•</sup> (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>P. holosteam</i> , Kopaonik								
2.60	0.217	0.205	0.210	0.217	14.78	20.23	18.23	17.75
5.21	0.185	0.172	0.173	0.185	31.30	38.02	37.48	35.60
10.42	0.121	0.100	0.103	0.121	62.08	72.36	71.03	68.49
20.83	0.063	0.056	0.057	0.063	90.59	94.18	93.60	92.79
41.67	0.056	0.055	0.056	0.056	96.77	96.98	96.67	96.81
83.33	0.058	0.056	0.058	0.058	94.14	94.91	94.00	94.35
166.67	0.060	0.061	0.061	0.060	94.85	94.29	94.69	94.61
333.33	0.066	0.065	0.064	0.066	95.97	96.41	96.77	96.38
Kontrola	0.253	0.245	0.221	0.036				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					7.57	6.19	6.37	6.28±0.13
<i>P. lanceolata</i> , Bar								
2.60	0.235	0.143	0.187	0.235	19.13	24.42	22.97	25.87
5.21	0.213	0.131	0.178	0.213	28.67	32.95	28.39	32.13
10.42	0.171	0.092	0.135	0.171	55.67	66.16	60.40	56.04
20.83	0.099	0.053	0.066	0.099	90.39	92.53	92.37	86.07
41.67	0.056	0.051	0.054	0.056	92.43	92.83	92.78	94.68
83.33	0.055	0.051	0.056	0.055	93.49	93.56	91.33	95.08
166.67	0.057	0.054	0.057	0.057	95.04	96.09	95.85	95.13
333.33	0.061	0.057	0.058	0.061	88.97	93.25	93.18	94.35
Kontrola	0.227	0.224	0.237	0.036				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					9.74	4.68	9.00	9.37±0.52
<i>P. lanceolata</i> , Fruška gora								
2.60	0.178	0.176	0.175	0.045	29.39	30.46	30.89	30.24
5.20	0.132	0.140	0.119	0.046	54.67	50.09	61.48	55.41
10.40	0.058	0.058	0.060	0.047	94.17	93.78	93.11	93.68
20.83	0.058	0.064	0.064	0.045	93.30	90.09	90.05	91.15
41.67	0.058	0.060	0.061	0.048	94.44	93.47	92.98	93.63
83.33	0.061	0.059	0.060	0.050	94.32	95.29	94.69	94.77
166.67	0.059	0.058	0.060	0.049	95.01	95.23	94.52	94.92
333.33	0.063	0.064	0.067	0.056	96.42	95.99	94.04	95.48
Kontrola	0.228	0.232	0.240	0.036				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					4.22	4.38	4.01	4.20±0.19

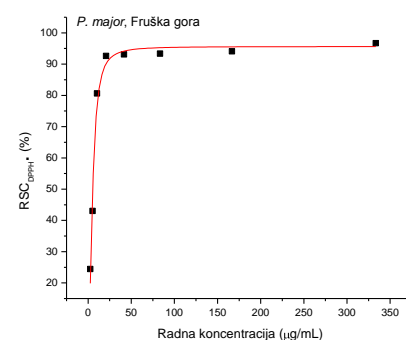
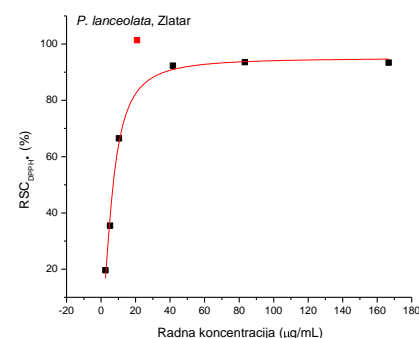
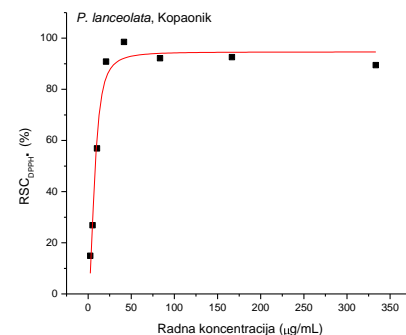


Grafik 8.10. Zavisnost  
RSC<sub>DPPH<sup>•</sup></sub> - radna  
koncentracija ekstrakata  
*P. holosteam*, Kopaonik  
*P. lanceolata*, Bar  
*P. lanceolata*, Fruška gora

Tabela 8.18. Neutralizacija DPPH<sup>•</sup> radikala

(P. lanceolata, Kopaonik; P. lanceolata, Zlatar; P. major, Fruška gora)

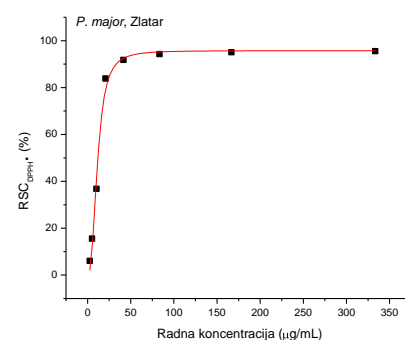
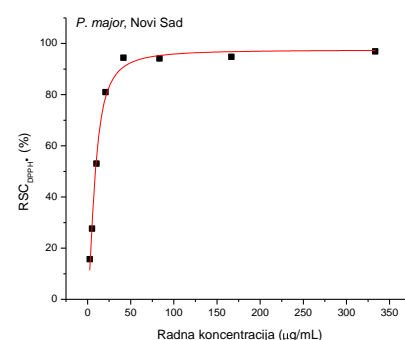
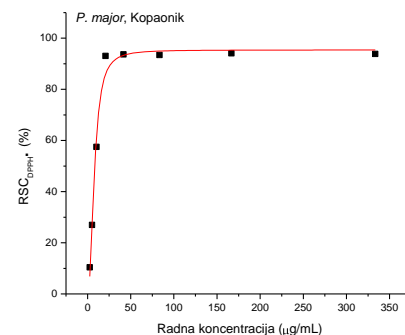
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC <sub>DPPH</sub> <sup>•</sup> (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>P. lanceolata</i> , Kopaonik								
2.60	0.210	0.224	0.224	0.045	19.48	12.61	12.52	14.87
5.21	0.198	0.192	0.194	0.045	25.32	28.05	27.22	26.86
10.42	0.124	0.141	0.139	0.046	62.05	53.89	54.68	56.88
20.83	0.066	0.060	0.062	0.044	89.27	92.12	91.18	90.86
41.67	0.058	0.059	0.058	0.055	98.62	98.28	98.71	98.54
83.33	0.060	0.068	0.062	0.047	93.82	89.76	92.88	92.16
166.67	0.061	0.065	0.062	0.047	93.23	91.51	92.90	92.55
333.33	0.071	0.070	0.094	0.057	93.05	93.51	81.75	89.44
Kontrola	0.248	0.246	0.221	0.036				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					7.87	8.42	8.4	8.23±0.31
<i>P. lanceolata</i> , Zlatar								
2.60	0.215	0.215	0.240	0.059	23.57	23.58	11.73	23.57
5.21	0.179	0.174	0.183	0.046	35.14	37.76	33.40	35.14
10.42	0.117	0.115	0.116	0.047	65.89	67.07	66.44	65.89
20.83	0.061	0.062	0.061	0.064	100.0	101.02	101.5	101.64
41.67	0.061	0.061	0.061	0.045	92.40	92.17	92.32	92.40
83.33	0.061	0.062	0.062	0.049	93.83	93.43	93.41	93.83
166.67	0.060	0.062	0.066	0.049	94.50	93.74	91.93	94.50
Kontrola	0.248	0.246	0.221	0.036				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					6.93	6.60	7.27	6.93±0.34
<i>P. major</i> , Fruška gora								
2.60	0.188	0.192	0.192	0.048	25.68	23.81	23.82	24.43
5.20	0.146	0.154	0.159	0.046	46.84	42.51	39.76	43.04
10.40	0.079	0.084	0.081	0.045	81.87	79.38	80.57	80.60
20.83	0.061	0.057	0.057	0.044	91.18	93.42	93.28	92.63
41.67	0.056	0.061	0.058	0.045	94.25	91.60	93.44	93.10
83.33	0.060	0.058	0.061	0.047	92.98	94.28	92.86	93.37
166.67	0.057	0.058	0.059	0.047	94.63	94.02	93.67	94.11
333.33	0.067	0.060	0.061	0.057	94.24	98.11	97.67	96.68
Kontrola	0.228	0.232	0.240	0.036				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					5.02	5.45	5.58	5.35±0.29



Grafik 8.11. Zavisnost RSC<sub>DPPH<sup>•</sup></sub> - radna koncentracija ekstrakata *P. lanceolata*, Kopaonik  
*P. lanceolata*, Zlatar  
*P. major*, Fruška gora

Tabela 8.19. Neutralizacija DPPH<sup>•</sup> radikala  
(*P. major*, Kopaonik; *P. major*, Novi Sad; *P. major*, Zlatar)

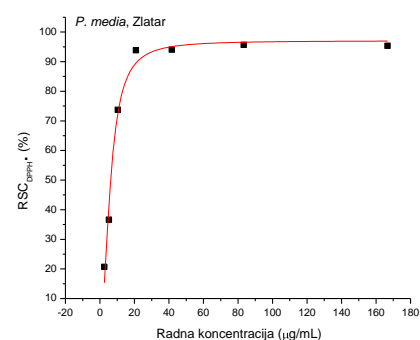
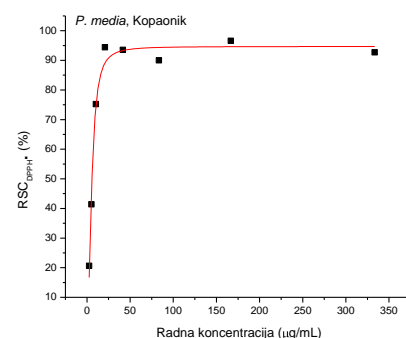
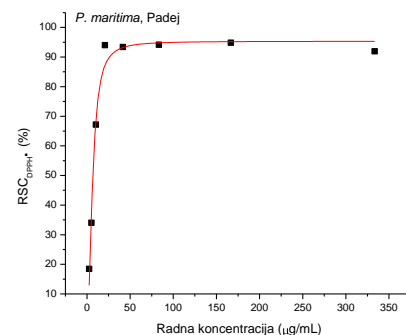
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC <sub>DPPH</sub> <sup>•</sup> (%)				Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3		
<i>P. major</i> , Kopaonik									
2.60	0.223	0.215	0.222	0.045	8.89	12.84	9.44	10.39	
5.21	0.193	0.187	0.192	0.047	25.85	28.77	26.26	26.96	
10.42	0.112	0.139	0.140	0.047	66.85	53.23	52.47	57.51	
20.83	0.063	0.057	0.060	0.046	91.49	94.55	93.11	93.05	
41.67	0.054	0.061	0.058	0.045	95.43	91.95	93.68	93.69	
83.33	0.059	0.058	0.062	0.047	93.73	94.12	92.34	93.40	
166.67	0.058	0.056	0.059	0.046	93.89	94.90	93.51	94.10	
333.33	0.061	0.064	0.062	0.050	94.62	93.07	93.86	93.85	
Kontrola	0.224	0.254	0.228	0.036					
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					7.72	8.40	8.40	8.17±0.39	
<i>P. major</i> , Novi Sad									
2.60	0.221	0.216	0.217	0.045	14.15	16.68	16.28	15.70	
5.21	0.192	0.204	0.192	0.048	29.72	23.54	29.56	27.61	
10.42	0.142	0.136	0.149	0.046	53.31	55.96	49.91	53.06	
20.83	0.083	0.085	0.090	0.047	82.36	81.52	79.14	81.00	
41.67	0.059	0.056	0.059	0.047	93.93	95.40	93.92	94.41	
83.33	0.058	0.057	0.060	0.046	94.38	94.73	93.35	94.15	
166.67	0.061	0.062	0.061	0.051	94.93	94.40	95.02	94.78	
333.33	0.065	0.067	0.066	0.060	97.26	96.68	96.82	96.92	
Kontrola	0.248	0.248	0.246	0.036					
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					8.82	8.98	9.26	9.02±0.22	
<i>P. major</i> , Zlatar									
2.60	0.230	0.231	0.230	0.046	6.16	5.72	6.29	6.06	
5.20	0.195	0.237	0.209	0.048	25.02	3.44	18.17	15.54	
10.40	0.160	0.175	0.184	0.049	43.62	35.73	31.08	36.81	
20.83	0.083	0.069	0.079	0.045	81.00	87.69	82.86	83.85	
41.67	0.066	0.060	0.062	0.046	90.12	92.96	92.20	91.76	
83.33	0.058	0.055	0.056	0.045	93.57	94.81	94.51	94.30	
166.67	0.057	0.055	0.056	0.046	94.58	95.35	95.17	95.03	
333.33	0.062	0.062	0.061	0.053	95.39	95.36	95.87	95.54	
Kontrola	0.224	0.254	0.228	0.036					
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					11.35	12.02	12.56	11.98±0.68	



Grafik 8.12. Zavisnost  
RSC<sub>DPPH<sup>•</sup></sub> - radna  
koncentracija ekstrakata  
*P. major*, Kopaonik  
*P. major*, Novi Sad  
*P. major*, Zlatar

Tabela 8.20. Neutralizacija DPPH<sup>•</sup> radikala  
(*P. maritima*, Padej; *P. media*, Kopaonik; *P. media*, Zlatar)

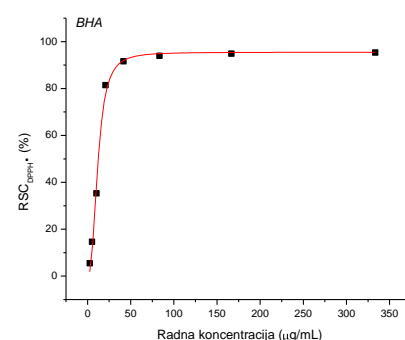
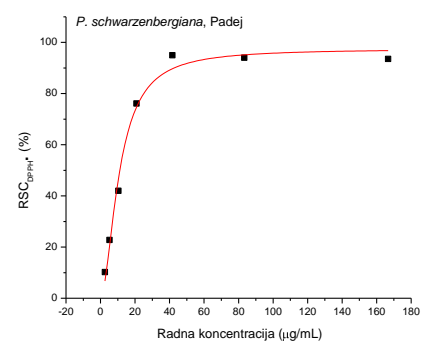
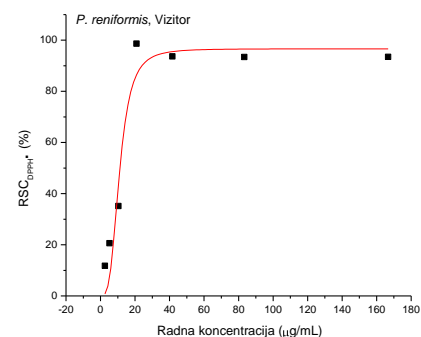
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC <sub>DPPH</sub> · (%)			
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	Srednja vrednost
<i>P. maritima</i> , Padej								
2.60	0.199	0.198	0.197	0.042	17.97	18.43	19.02	18.47
5.21	0.172	0.177	0.177	0.049	35.80	33.08	33.14	34.01
10.42	0.105	0.108	0.110	0.045	68.57	67.07	65.89	67.18
20.83	0.057	0.057	0.056	0.045	93.74	94.02	94.22	93.99
41.67	0.059	0.058	0.059	0.046	93.19	93.66	93.25	93.36
83.33	0.056	0.058	0.058	0.046	94.74	93.99	93.75	94.16
166.67	0.061	0.061	0.065	0.052	95.68	95.35	93.49	94.84
333.33	0.066	0.065	0.067	0.050	91.94	92.38	91.40	91.90
Kontrola	0.253	0.245	0.221	0.048				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					6.61	6.87	6.89	6.79±0.16
<i>P. media</i> , Kopaonik								
2.60	0.193	0.196	0.194	0.041	21.38	19.72	20.75	20.62
5.21	0.163	0.163	0.165	0.050	41.77	41.71	40.74	41.41
10.42	0.093	0.097	0.091	0.046	75.43	73.71	76.59	75.24
20.83	0.055	0.055	0.057	0.045	94.76	94.70	93.74	94.40
41.67	0.058	0.055	0.056	0.044	92.60	94.31	93.62	93.51
83.33	0.055	0.072	0.063	0.044	94.37	85.34	90.28	90.00
166.67	0.058	0.057	0.059	0.051	96.71	97.22	95.81	96.58
333.33	0.060	0.062	0.060	0.047	93.06	91.86	93.20	92.71
Kontrola	0.227	0.224	0.237	0.038				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					5.73	5.82	5.76	5.77±0.05
<i>P. media</i> , Zlatar								
2.60	0.193	0.199	0.193	0.042	21.54	18.92	21.54	20.67
5.20	0.166	0.169	0.165	0.044	36.98	35.26	37.62	36.62
10.40	0.103	0.113	0.107	0.057	76.14	70.84	74.13	73.71
20.83	0.056	0.055	0.062	0.046	94.77	95.16	91.59	93.84
41.67	0.054	0.060	0.054	0.044	95.07	91.82	95.26	94.05
83.33	0.056	0.055	0.056	0.047	95.73	95.86	95.33	95.64
166.67	0.054	0.056	0.055	0.046	95.69	95.01	95.38	95.36
Kontrola	0.227	0.224	0.237	0.038				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					6.04	6.50	6.12	6.22±0.25



Grafik 8.13. Zavisnost  
RSC<sub>DPPH<sup>•</sup></sub> - radna  
koncentracija ekstrakata  
*P. maritima*, Padej  
*P. media*, Kopaonik  
*P. media*, Zlatar

Tabela 8.21. Neutralizacija DPPH<sup>•</sup> radikala  
(*P. reniformis*, Vizitor; *P. schwarzenbergiana*, Padej; BHA)

Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC <sub>DPPH</sub> <sup>•</sup> (%)			
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	Srednja vrednost
<i>P. reniformis</i> , Vizitor								
2.60	0.204	0.209	0.200	0.040	11.97	9.41	13.94	11.78
5.21	0.186	0.184	0.183	0.037	19.71	20.82	21.35	20.63
10.42	0.160	0.157	0.157	0.037	34.14	35.75	35.56	35.15
20.83	0.085	0.071	0.092	0.080	97.26	105.11	93.63	98.67
41.67	0.049	0.049	0.049	0.037	93.53	93.55	93.89	93.66
83.33	0.050	0.050	0.050	0.038	93.31	93.45	93.42	93.40
166.67	0.053	0.053	0.053	0.041	93.25	93.74	93.51	93.50
Kontrola	0.222	0.231	0.216	0.037				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					11.54	10.69	10.97	11.07±0.43
<i>P. schwarzenbergiana</i> , Padej								
2.60	0.219	0.224	0.242	0.045	14.87	12.22	3.62	10.24
5.21	0.198	0.211	0.203	0.046	25.65	19.29	23.32	22.76
10.42	0.154	0.157	0.177	0.044	46.21	44.61	35.11	41.98
20.83	0.083	0.097	0.096	0.043	80.57	73.85	73.97	76.13
41.67	0.056	0.057	0.056	0.046	95.18	94.59	95.18	94.98
83.33	0.056	0.056	0.057	0.044	94.34	94.19	93.52	94.02
166.67	0.057	0.060	0.060	0.046	94.48	92.96	93.19	93.54
Kontrola	0.253	0.245	0.221	0.036				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					10.07	11.25	10.50	10.61±0.6
BHA								
2.60	0.231	0.231	0.230	0.231	5.26	5.15	5.92	5.44
5.20	0.197	0.239	0.210	0.197	24.15	2.47	17.25	14.62
10.40	0.162	0.178	0.186	0.162	41.97	34.09	29.72	35.26
20.83	0.087	0.073	0.083	0.087	78.44	85.64	80.28	81.45
41.67	0.065	0.061	0.062	0.065	90.31	92.46	91.89	91.55
83.33	0.058	0.056	0.056	0.058	93.35	94.32	94.23	93.97
166.67	0.056	0.055	0.055	0.056	94.53	95.04	94.99	94.85
333.33	0.061	0.062	0.061	0.061	95.36	95.01	95.54	95.30
Kontrola	0.224	0.255	0.229	0.03				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					11.72	12.33	13	12.35±0.64

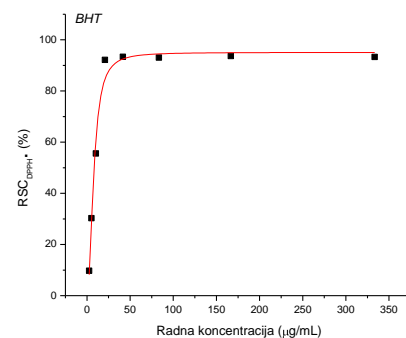


Grafik 8.14. Zavisnost  
RSC<sub>DPPH<sup>•</sup></sub> - radna  
koncentracija ekstrakata  
*P. reniformis*, Vizitor  
*P. schwarzenbergiana*, Padej  
BHA



Tabela 8.22. Neutralizacija DPPH<sup>•</sup> radikala (BHT)

Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC <sub>DPPH</sub> · (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
BHT								
2.60	0.224	0.216	0.223	0.044	8.11	12.38	8.64	9.71
5.21	0.194	0.188	0.194	0.055	29.14	32.20	29.42	30.26
10.42	0.115	0.141	0.143	0.046	64.78	51.49	50.52	55.60
20.83	0.064	0.058	0.061	0.045	90.64	93.64	92.17	92.15
41.67	0.054	0.060	0.058	0.045	95.12	91.97	93.00	93.36
83.33	0.059	0.058	0.063	0.046	93.55	94.21	91.33	93.03
166.67	0.058	0.056	0.060	0.045	93.45	94.81	92.78	93.68
333.33	0.060	0.065	0.063	0.049	94.54	92.29	93.13	93.32
Kontrola	0.224	0.255	0.229	0.03				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					7.77	8.3	8.77	8.28±0.5

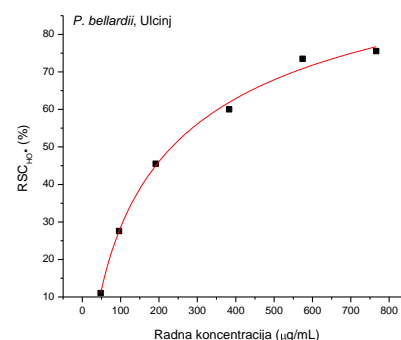
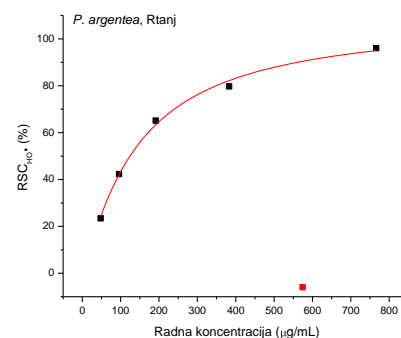
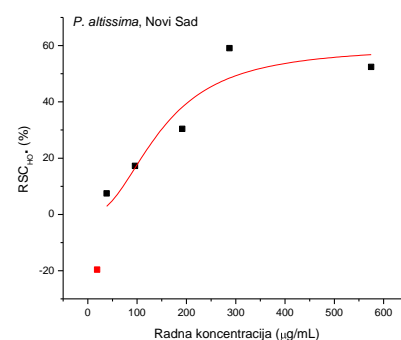
Grafik 8.15. Zavisnost  
RSC<sub>DPPH<sup>•</sup></sub> - radna  
koncentracija BHT

### 8.2.2. Kapacitet „hvatanja“ HO<sup>•</sup> radikala

Tabela 8.23. Kapacitet „hvatanja“ HO<sup>•</sup> radikala

(P. altissima, Novi Sad; P. argentea, Rtanj; P. bellardii, Ulcinj)

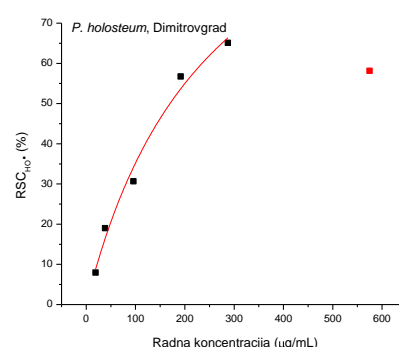
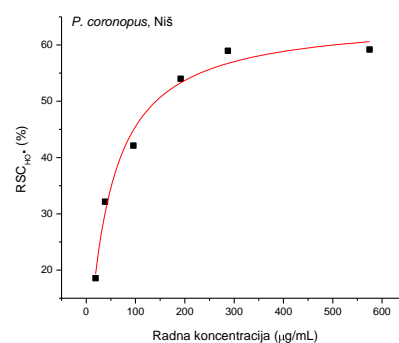
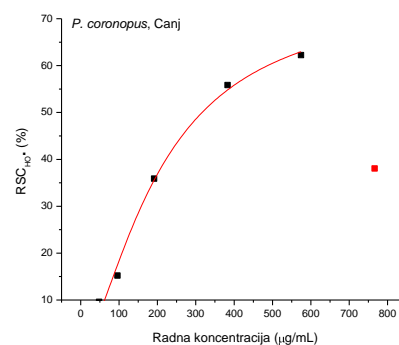
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC <sub>HO•</sub> (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>P. altissima</i> , Novi Sad								
19.16	0.173	0.187	0.184	0.050	-12.32	-24.28	-22.34	-19.65
38.31	0.196	0.183	0.197	0.090	3.68	15.71	3.03	7.47
95.79	0.212	0.227	0.224	0.130	25.56	11.72	14.48	17.25
191.57	0.280	0.280	0.269	0.200	26.89	27.25	37.13	30.42
287.36	0.341	0.351	0.360	0.305	68.00	58.78	50.46	59.08
574.71	0.572	0.592	0.575	0.527	59.80	41.24	56.26	52.43
Kontrola	0.150	0.150	0.134	0.034				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					254.81	323.72	301.31	312.52 ±15.85
<i>P. argentea</i> , Rtanj								
47.89	0.456	0.417	0.471	0.456	21.40	31.53	17.36	23.43
95.79	0.481	0.510	0.480	0.481	44.81	37.09	45.03	42.31
191.57	0.620	0.593	0.601	0.620	61.05	68.16	66.11	65.11
383.14	1.005	0.962	0.954	1.005	71.54	82.85	84.73	79.71
574.71	1.503	1.432	1.362	1.503	-24.17	-5.87	12.31	-5.91
766.28	1.622	1.613	1.613	1.622	94.52	96.88	96.79	96.06
Kontrola	0.406	0.432	0.426	0.04				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					123.81	118.05	119.54	120.47 ±2.99
<i>P. bellardii</i> , Ulcinj								
47.89	0.430	0.386	0.382	0.054	3.18	14.37	15.49	11.01
95.79	0.326	0.334	0.386	0.067	33.41	31.30	17.97	27.56
191.57	0.277	0.310	0.316	0.090	51.72	43.16	41.62	45.50
383.14	0.298	0.279	0.263	0.125	55.47	60.30	64.28	60.01
574.71	0.276	0.287	0.265	0.173	73.50	70.73	76.23	73.49
766.28	0.299	0.290	0.268	0.191	72.19	74.44	80.02	75.55
Kontrola	0.435	0.432	0.428	0.04				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					221.91	240.32	241.75	234.66 ±11.06



Grafik 8.16. Zavisnost RSC<sub>HO•</sub> - radna koncentracija ekstrakata  
*P. altissima*, Novi Sad  
*P. argentea*, Rtanj  
*P. bellardii*, Ulcinj

Tabela 8.24. Kapacitet „hvatanja“ HO<sup>•</sup> radikala  
(*P. coronopus*, Čanj; *P. coronopus*, Niš; *P. holosteum*, Dimitrovgrad)

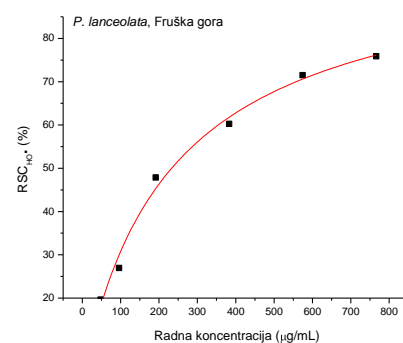
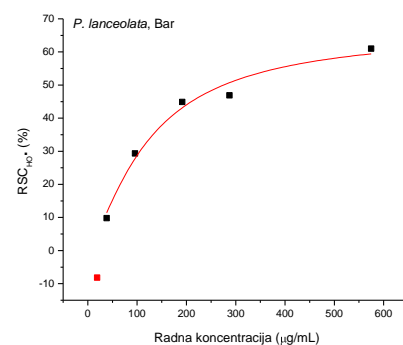
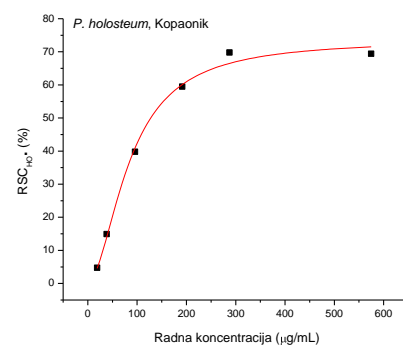
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC <sub>HO•</sub> (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>P. coronopus</i> , Čanj								
47.89	0.400	0.383	0.383	0.047	6.57	11.06	11.20	9.61
95.79	0.366	0.365	0.378	0.049	16.22	16.38	13.05	15.21
191.57	0.319	0.295	0.307	0.064	32.69	38.99	36.00	35.89
383.14	0.263	0.234	0.249	0.082	52.16	59.66	55.74	55.85
574.71	0.236	0.247	0.228	0.094	62.52	59.61	64.52	62.22
766.28	0.242	0.224	0.597	0.120	67.75	72.51	-26.15	38.04
Kontrola	0.441	0.375	0.418	0.04				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					350.58	331.36	318.34	324.85 ±9.21
<i>P. coronopus</i> , Niš								
19.16	0.589	0.613	0.615	0.061	21.04	17.45	17.15	18.55
38.31	0.532	0.532	0.543	0.082	32.71	32.71	31.06	32.16
95.79	0.470	0.505	0.507	0.107	45.72	40.48	40.18	42.13
191.57	0.458	0.458	0.475	0.156	54.84	54.84	52.30	53.99
287.36	0.456	0.405	0.463	0.167	56.78	64.41	55.74	58.98
574.71	0.471	0.457	0.464	0.191	58.13	60.22	59.17	59.17
Kontrola	0.69	0.646	0.663	0.00				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					133.19	131.86	136.54	133.86 ±2.41
<i>P. holosteum</i> , Dimitrovgrad								
19.16	0.665	0.648	0.688	0.055	8.27	10.83	4.81	7.97
38.31	0.706	0.643	0.660	0.131	13.53	23.01	20.45	19.00
95.79	0.809	0.691	0.663	0.260	17.44	35.19	39.40	30.68
191.57	0.728	0.766	0.731	0.454	58.80	53.08	58.35	56.74
287.36	0.863	0.816	0.805	0.596	59.85	66.92	68.57	65.11
574.71	1.024	1.046	0.988	0.741	57.44	54.14	62.86	58.15
Kontrola	0.65	0.673	0.671	0.00				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					179.33	159.11	155.00	164.48 ±13.02



Grafik 8.17. Zavisnost  
RSC<sub>HO•</sub> - radna  
koncentracija ekstrakata  
*P. coronopus*, Čanj  
*P. coronopus*, Niš  
*P. holosteum*, Dimitrovgrad

Tabela 8.25. Kapacitet „hvatanja“ HO<sup>•</sup> radikala  
(*P. holosteam*, Kopaonik; *P. lanceolata*, Bar; *P. lanceolata*, Fruška gora)

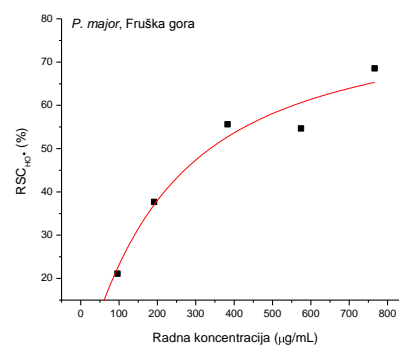
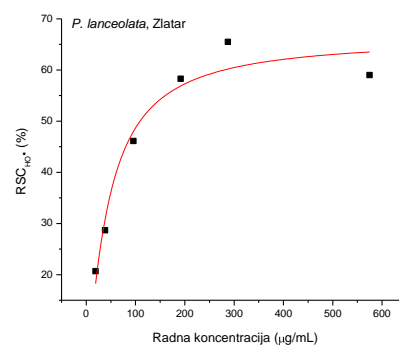
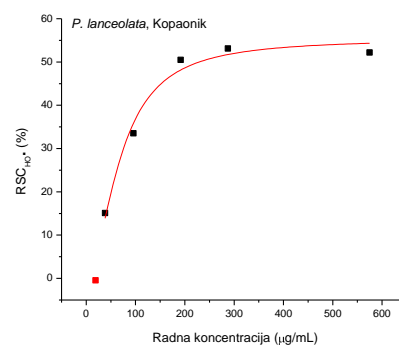
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC <sub>HO•</sub> (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>P. holosteam</i> , Kopaonik								
19.16	0.623	0.620	0.616	0.036	4.19	4.68	5.34	4.74
38.31	0.636	0.587	0.593	0.084	9.91	17.90	16.93	14.91
95.79	0.597	0.578	0.592	0.220	38.47	41.57	39.29	39.77
191.57	0.606	0.601	0.612	0.358	59.52	60.34	58.54	59.47
287.36	0.668	0.667	0.657	0.479	69.15	69.32	70.95	69.81
574.71	0.768	0.802	0.780	0.596	71.93	66.38	69.97	69.42
Kontrola	0.63	0.643	0.570	0.00				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					132.57	119.48	129.52	127.19 ±6.85
<i>P. lanceolata</i> , Bar								
19.16	0.608	0.642	0.596	0.039	-6.81	-13.20	-4.56	-6.81
38.31	0.581	0.576	0.606	0.107	11.02	11.96	6.33	11.02
95.79	0.563	0.579	0.563	0.192	30.35	27.35	30.35	30.35
191.57	0.589	0.600	0.580	0.296	45.00	42.93	46.69	45.00
287.36	0.630	0.638	0.631	0.350	47.44	45.94	47.25	47.44
574.71	0.783	0.759	0.767	0.562	58.51	63.02	61.52	58.51
Kontrola	0.54	0.524	0.533	0.00				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					280.03	265.69	271.11	272.28 ±7.24
<i>P. lanceolata</i> , Fruška gora								
47.89	0.402	0.421	0.403	0.402	21.23	16.52	21.19	19.65
95.79	0.384	0.433	0.420	0.384	34.12	21.75	25.01	26.96
191.57	0.426	0.440	0.441	0.426	50.20	46.81	46.58	47.86
383.14	0.559	0.521	0.554	0.559	56.63	66.18	57.94	60.25
574.71	0.547	0.559	0.547	0.547	72.65	69.46	72.47	71.53
766.28	0.747	0.711	0.700	0.747	68.96	77.91	80.80	75.89
Kontrola	0.449	0.460	0.438	0.04				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					239.79	225.49	243.07	236.12 ±9.35



Grafik 8.18. Zavisnost  
RSC<sub>HO<sup>•</sup></sub> - radna  
koncentracija ekstrakata  
*P. holosteam*, Kopaonik  
*P. lanceolata*, Bar  
*P. lanceolata*, Fruška gora

Tabela 8.26. Kapacitet „hvatanja“ HO<sup>•</sup> radikala  
(*P. lanceolata*, Kopaonik; *P. lanceolata*, Zlatar; *P. major*, Fruška gora)

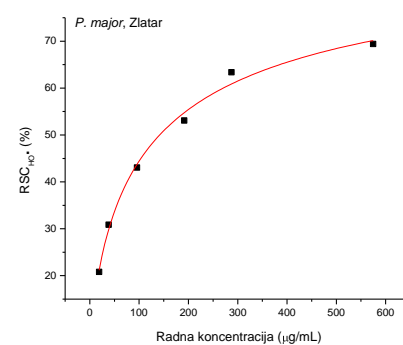
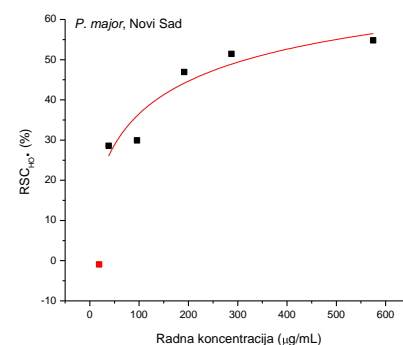
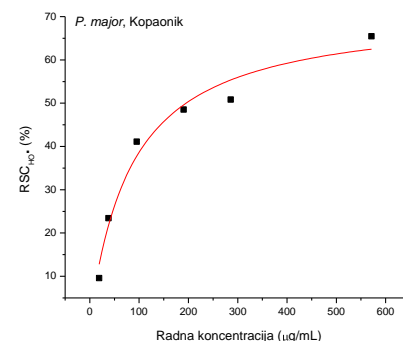
Radna konc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Apsorbancija				RSC <sub>HO•</sub> (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>P. lanceolata</i> , Kopaonik								
19.16	0.633	0.599	0.651	0.059	-1.41	4.59	-4.59	-0.47
38.31	0.615	0.634	0.622	0.143	16.61	13.25	15.37	15.08
95.79	0.672	0.706	0.687	0.312	36.40	30.39	33.75	33.51
191.57	0.778	0.743	0.751	0.477	46.82	53.00	51.59	50.47
287.36	0.832	0.881	0.889	0.602	59.36	50.71	49.29	53.12
574.71	1.128	0.997	1.090	0.801	42.23	65.37	48.94	52.18
Kontrola	0.54	0.464	0.596	0.00				
IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )					204.45	219.72	196.24	206.80 ±11.92
<i>P. lanceolata</i> , Zlatar								
19.16	0.589	0.541	0.499	0.065	13.06	21.02	27.99	20.69
38.31	0.604	0.605	0.597	0.172	28.32	28.16	29.48	28.65
95.79	0.643	0.647	0.638	0.318	46.08	45.41	46.91	46.13
191.57	0.758	0.760	0.745	0.503	57.69	57.36	59.85	58.30
287.36	0.859	0.931	0.829	0.665	67.81	55.87	72.79	65.49
574.71	0.882	1.180	1.076	0.799	86.23	36.78	54.04	59.02
Kontrola	0.52	0.627	0.661					
IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )					120.92	132.84	118.70	124.15 ±7.60
<i>P. major</i> , Fruška gora								
47.89	0.425	0.394	0.426	0.068	9.76	17.70	9.71	12.39
95.79	0.376	0.371	0.356	0.055	18.88	20.37	24.10	21.12
191.57	0.332	0.311	0.291	0.064	32.35	37.86	42.82	37.68
383.14	0.272	0.261	0.259	0.088	53.52	56.41	56.92	55.62
574.71	0.286	0.250	0.261	0.086	49.59	58.59	55.73	54.64
766.28	0.229	0.240	0.245	0.113	70.83	68.01	66.71	68.52
Kontrola	0.425	0.423	0.437	0.04				
IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )					349.64	335.31	330.86	338.60 ±9.81



Grafik 8.19. Zavisnost  
RSC<sub>HO<sup>•</sup></sub>-radna koncentracija  
ekstrakata  
*P. lanceolata*, Kopaonik  
*P. lanceolata*, Zlatar  
*P. major*, Fruška gora

Tabela 8.27. Kapacitet „hvatanja“ HO<sup>•</sup> radikala  
(*P. major*, Kopaonik; *P. major*, Novi Sad; *P. major*, Zlatar)

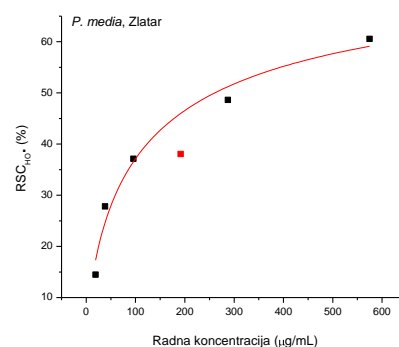
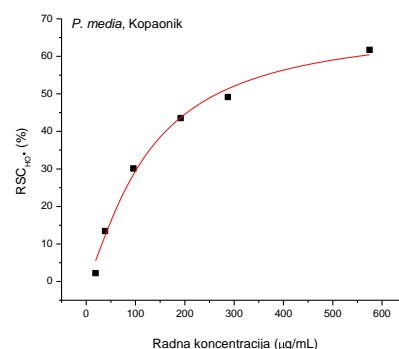
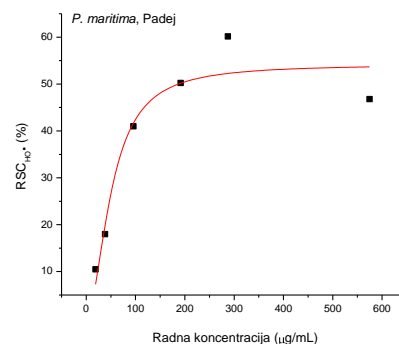
Radna konc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Apsorbancija				RSC <sub>HO•</sub> (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>P. major</i> , Kopaonik								
19.16	0.626	0.614	0.607	0.025	8.01	9.84	10.91	9.59
38.31	0.538	0.558	0.558	0.051	25.46	22.39	22.39	23.41
95.79	0.487	0.490	0.510	0.111	42.45	41.99	38.93	41.12
191.57	0.478	0.489	0.498	0.152	50.10	48.42	47.04	48.52
287.36	0.482	0.491	0.465	0.158	50.41	49.03	53.01	50.81
574.71	0.512	0.510	0.489	0.278	64.18	64.49	67.70	65.46
Kontrola	0.73	0.626	0.606	0.00				
IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )					205.25	199.76	209.97	204.99 ±5.11
<i>P. major</i> , Novi Sad								
19.16	0.711	0.717	0.740	0.013	0.71	-0.14	-3.41	-0.95
38.31	0.563	0.583	0.570	0.070	29.87	27.03	28.88	28.59
95.79	0.555	0.559	0.577	0.071	31.15	30.58	28.02	29.92
191.57	0.517	0.514	0.523	0.145	47.08	47.51	46.23	46.94
287.36	0.492	0.498	0.487	0.151	51.49	50.64	52.20	51.45
574.71	0.483	0.493	0.484	0.169	55.33	53.91	55.19	54.81
Kontrola	0.72	0.717	0.675	0.00				
IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )					260.16	263.17	259.76	261.03 ±1.86
<i>P. major</i> , Zlatar								
19.16	0.550	0.506	0.501	0.034	15.73	22.91	23.73	20.79
38.31	0.483	0.497	0.497	0.069	32.39	30.10	30.10	30.86
95.79	0.483	0.485	0.480	0.134	43.00	42.68	43.49	43.06
191.57	0.488	0.483	0.473	0.194	51.98	52.80	54.43	53.07
287.36	0.504	0.501	0.484	0.272	62.11	62.60	65.38	63.36
574.71	0.569	0.529	0.562	0.366	66.85	73.38	67.99	69.40
Kontrola	0.64	0.667	0.533					
IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )					139.91	144.71	147.79	144.14 ±3.97



Grafik 8.20. Zavisnost  
RSC<sub>HO<sup>•</sup></sub> - radna  
koncentracija ekstrakata  
*P. major*, Kopaonik  
*P. major*, Novi Sad  
*P. major*, Zlatar

Tabela 8.28. Kapacitet „hvatanja“ HO<sup>•</sup> radikala  
(*P. maritima*, Padej; *P. media*, Kopaonik; *P. media*, Zlatar)

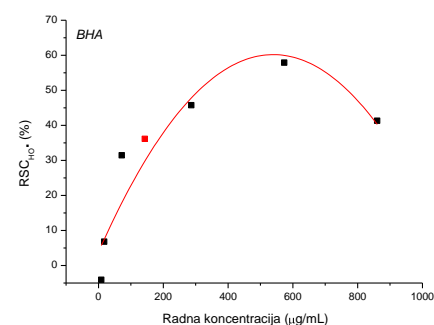
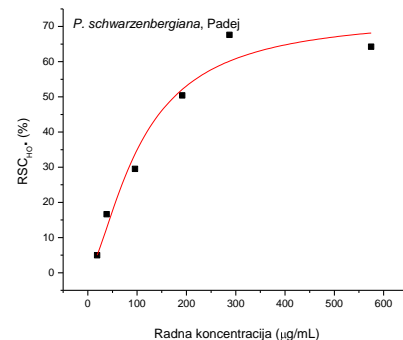
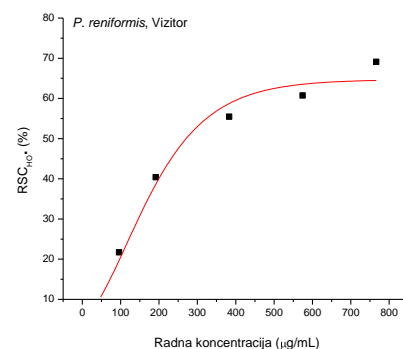
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC <sub>HO•</sub> (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>P. maritima</i> , Padej								
19.16	0.693	0.685	0.677	0.089	9.27	10.47	11.67	10.47
38.31	0.667	0.715	0.703	0.149	22.19	14.98	16.78	17.98
95.79	0.732	0.709	0.758	0.340	41.11	44.57	37.21	40.96
191.57	0.781	0.803	0.847	0.479	54.63	51.33	44.72	50.23
287.36	0.869	0.924	0.779	0.592	58.39	50.13	71.91	60.14
574.71	1.146	1.142	1.160	0.795	47.27	47.87	45.17	46.77
Kontrola	0.69	0.646	0.663	0.00				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					195.92	179.85	188.16	187.98 ±8.04
<i>P. media</i> , Kopaonik								
19.16	0.553	0.540	0.506	0.033	-1.70	0.84	7.49	4.16
38.31	0.537	0.540	0.506	0.085	11.60	11.01	17.66	13.42
95.79	0.516	0.507	0.526	0.159	30.18	31.94	28.22	30.11
191.57	0.565	0.587	0.578	0.288	45.82	41.52	43.28	43.54
287.36	0.591	0.578	0.556	0.315	46.02	48.56	52.87	49.15
574.71	0.657	0.657	0.644	0.457	60.88	60.88	63.43	61.73
Kontrola	0.57	0.487	0.473					
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					278.17	272.05	263.01	271.08 ±7.63
<i>P. media</i> , Zlatar								
19.16	0.552	0.545	0.566	0.034	14.87	16.02	12.57	14.49
38.31	0.498	0.491	0.560	0.077	30.81	31.96	20.62	27.80
95.79	0.512	0.552	0.507	0.141	39.03	32.46	39.85	37.11
191.57	0.654	0.605	0.547	0.225	29.50	37.55	47.08	38.04
287.36	0.608	0.647	0.601	0.306	50.37	43.96	51.52	48.62
574.71	0.712	0.712	0.712	0.472	60.56	60.56	60.56	60.56
Kontrola	0.63	0.643	0.570	0.05				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					218.43	341.56	242.94	230.69 ±17.33



Grafik 8.21. Zavisnost  
RSC<sub>HO<sup>•</sup></sub> -radna  
koncentracija ekstrakata  
*P. maritima*, Padej  
*P. media*, Kopaonik  
*P. media*, Zlatar

Tabela 8.29. Kapacitet „hvatanja“ HO<sup>•</sup> radikala  
(*P. reniformis*, Vizitor; *P. schwarzenbergiana*, Padej; BHA)

Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC <sub>HO•</sub> (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>P. reniformis</i> , Vizitor								
47.89	0.402	0.387	0.372	0.052	3.31	7.37	11.52	7.40
95.79	0.334	0.340	0.351	0.059	23.72	22.11	19.22	21.68
191.57	0.278	0.303	0.277	0.071	42.57	35.80	42.83	40.40
383.14	0.248	0.261	0.257	0.094	57.41	63.00	55.02	55.45
574.71	0.234	0.240	0.227	0.092	60.65	58.94	62.57	60.72
766.28	0.251	0.236	0.262	0.138	68.83	72.79	65.72	69.11
Kontrola	0.380	0.403	0.421	0.04				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					270.76	266.59	263.09	266.81 ±3.84
<i>P. schwarzenbergiana</i> , Padej								
19.16	0.640	0.640	0.621	0.033	3.96	3.96	6.96	4.96
38.31	0.629	0.613	0.597	0.086	14.08	16.61	19.15	16.61
95.79	0.630	0.593	0.680	0.189	30.22	36.08	22.31	29.54
191.57	0.615	0.611	0.611	0.299	50.00	50.63	50.63	50.42
287.36	0.654	0.627	0.626	0.431	64.72	68.99	69.15	67.62
574.71	0.757	0.752	0.759	0.530	64.08	64.87	63.77	64.24
Kontrola	0.64	0.599	0.656	0.00				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					179.67	176.78	188.34	181.60 ±6.02
BHA								
8.96	0.457	0.535	0.434	0.051	0.37	-18.69	6.12	-4.07
17.93	0.523	0.382	0.374	0.046	-16.91	17.79	19.55	6.81
35.85	0.558	0.535	0.390	0.052	-23.85	-18.31	17.16	-8.33
71.70	0.383	0.303	0.297	0.048	17.85	37.41	39.03	31.43
143.40	0.343	0.300	0.286	0.049	28.04	38.48	41.91	36.14
286.81	0.273	0.273	0.273	0.051	45.73	45.72	45.73	45.73
573.61	0.272	0.272	0.272	0.100	57.92	57.91	57.92	57.92
860.42	0.327	0.278	0.288	0.058	34.03	46.16	43.75	41.31
Kontrola	0.44	0.496	0.412	0.04				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					322.73	303.68	333.95	320.12 ±15.30

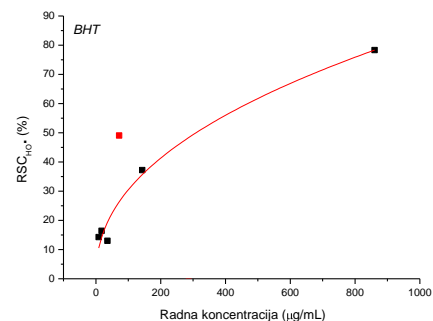


Grafik 8.22. Zavisnost  
RSC<sub>HO<sup>•</sup></sub> -radna  
koncentracija ekstrakta  
*P. reniformis*, Vizitor  
*P. schwarzenberg*., Padej  
BHA



Tabela 8.30. Kapacitet „hvatanja“ HO<sup>•</sup> radikala (BHT)

Radna konc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Apsorbancija				RSC <sub>HO•</sub> (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
BHT								
8.96	0.479	0.413	0.416	0.091	3.56	20.04	19.23	14.27
17.93	0.456	0.425	0.486	0.119	16.27	24.08	8.93	16.43
35.85	0.420	0.379	0.397	0.049	7.72	17.90	13.38	13.00
71.70	0.458	0.398	0.403	0.215	39.46	54.53	53.10	49.03
143.40	0.457	0.404	0.390	0.164	27.26	40.43	43.98	37.22
286.81	0.469	0.452	0.456	0.052	-3.61	0.66	-0.16	-1.04
573.61	0.447	0.475	0.455	0.049	1.10	-5.86	-0.88	-1.88
860.42	0.489	0.415	0.497	0.380	72.83	91.26	70.87	78.32
Kontrola	0.43	0.461	0.437	0.04				
IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )					116.37	247.31	233.68	220.04 ±19.28

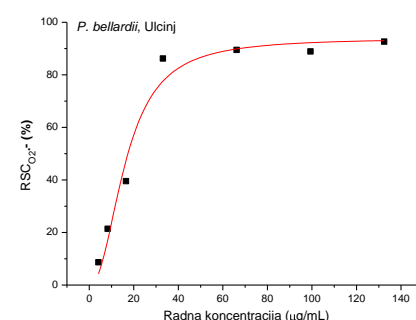
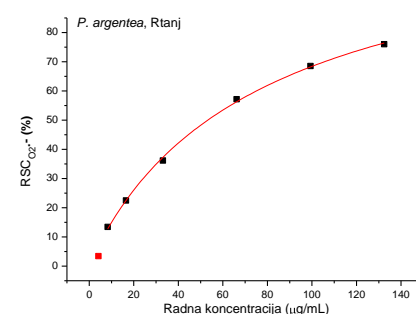
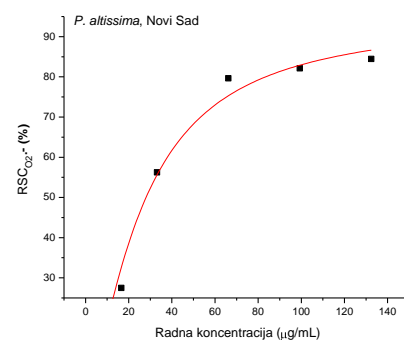
Grafik 8.23. Zavisnost  
RSC<sub>HO<sup>•</sup></sub> - radna  
koncentracija BHT

### 8.2.3. Kapacitet „hvatanja“ $O_2^{\cdot -}$ radikala

Tabela 8.31. Kapacitet „hvatanja“  $O_2^{\cdot -}$  radikala

(*P. altissima*, Novi Sad; *P. argentea*, Rtanj; *P. bellardii*, Ulcinj)

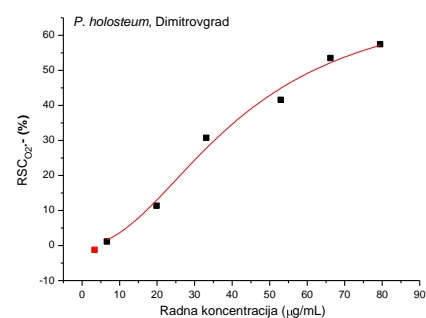
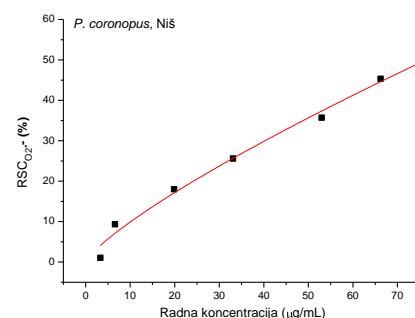
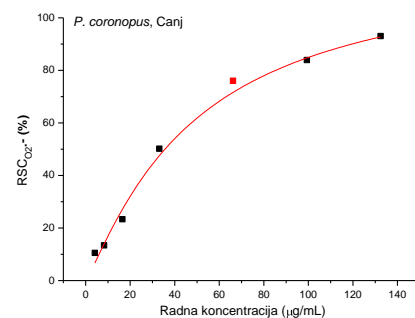
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC <sub>O<sub>2</sub>·</sub> (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>P. altissima</i> , Novi Sad								
4.14	0.217	0.220	0.215	0.002	11.27	10.03	12.09	11.13
8.28	0.201	0.209	0.205	0.004	18.70	15.39	17.04	17.04
16.56	0.178	0.186	0.187	0.008	29.84	26.54	26.12	27.50
33.11	0.104	0.136	0.114	0.012	62.03	48.82	57.90	56.25
66.23	0.067	0.064	0.062	0.015	78.54	79.78	80.60	79.64
99.34	0.063	0.059	0.056	0.016	80.60	82.25	83.49	82.12
132.45	0.051	0.055	0.055	0.016	85.56	83.90	83.90	84.45
Kontrola	0.240	0.242	0.245	0.00				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					25.43	28.73	27.49	27.22 ±1.67
<i>P. argentea</i> , Rtanj								
4.14	0.330	0.294	0.308	0.001	-2.59	8.64	4.27	3.44
8.28	0.282	0.279	0.275	0.001	12.38	13.31	14.56	13.42
16.56	0.249	0.251	0.249	0.001	22.67	22.05	22.67	22.46
33.11	0.192	0.196	0.196	0.003	41.07	39.82	39.82	40.23
66.23	0.128	0.134	0.156	0.002	60.71	58.84	51.98	57.18
99.34	0.096	0.106	0.110	0.003	71.00	67.88	66.64	68.51
132.45	0.077	0.083	0.080	0.003	76.93	75.05	75.99	75.99
Kontrola	0.314	0.324	0.321					
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					45.49	49.52	55.12	50.04 ±4.84
<i>P. bellardii</i> , Ulcinj								
4.14	0.303	0.307	0.287	0.006	7.39	6.14	12.38	8.64
8.28	0.262	0.252	0.269	0.009	21.11	24.23	18.93	21.42
16.56	0.188	0.195	0.220	0.007	43.56	41.38	33.58	39.51
33.11	0.052	0.049	0.053	0.007	85.97	86.90	85.66	86.18
66.23	0.041	0.041	0.043	0.008	89.71	89.71	89.09	89.50
99.34	0.043	0.044	0.047	0.009	89.40	89.09	88.15	88.88
132.45	0.034	0.033	0.040	0.012	93.14	93.45	91.27	92.62
Kontrola	0.310	0.321	0.322	0.00				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					16.70	16.71	18.78	17.40 ±1.20



Grafik 8.24. Zavisnost RSC $O_2^{\cdot -}$  - radna koncentracija ekstrakata  
*P. altissima*, Novi Sad  
*P. argentea*, Rtanj  
*P. bellardii*, Ulcinj

Tabela 8.32. Kapacitet „hvatanja“  $O_2^{\cdot-}$  radikala  
(*P. coronopus*, Čanj; *P. coronopus*, Niš; *P. holosteu*m, Dimitrovgrad)

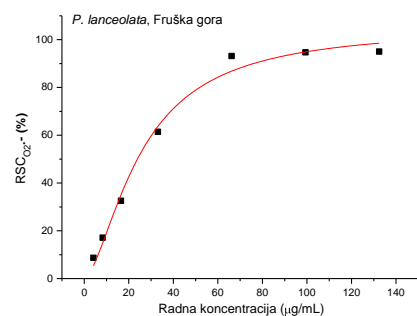
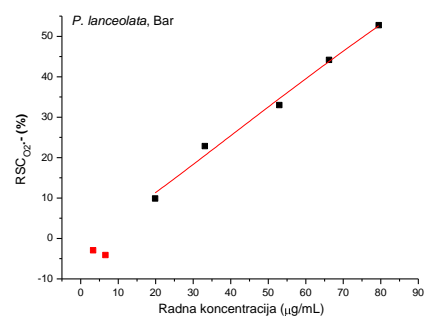
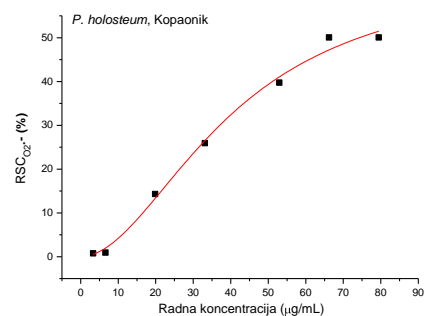
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC <sub>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></sub> (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>P. coronopus</i> , Čanj								
4.14	0.304	0.311	0.309	0.008	11.72	9.63	10.23	10.53
8.28	0.296	0.298	0.301	0.008	14.11	13.51	12.62	13.41
16.56	0.268	0.269	0.261	0.009	22.76	22.46	24.84	23.35
33.11	0.153	0.186	0.186	0.008	56.76	46.91	46.91	50.19
66.23	0.091	0.087	0.090	0.009	75.54	76.74	75.84	76.04
99.34	0.064	0.063	0.065	0.010	83.90	84.19	83.60	83.90
132.45	0.045	0.037	0.027	0.013	90.46	92.84	95.82	93.04
Kontrola	0.340	0.342	0.327	0.00				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					34.67	35.24	35.66	35.19 ±0.5
<i>P. coronopus</i> , Niš								
3.31	0.416	0.421	0.416	0.00	1.42	0.24	1.42	1.03
6.62	0.389	0.383	0.376	0.00	7.82	9.24	10.90	9.32
19.87	0.349	0.343	0.346	0.00	17.30	18.72	18.01	18.01
33.11	0.329	0.310	0.303	0.00	22.04	26.54	28.20	25.59
52.98	0.281	0.261	0.272	0.00	33.41	38.15	35.55	35.70
66.23	0.227	0.236	0.229	0.00	46.21	44.08	45.73	45.34
79.47	0.206	0.203	0.201	0.00	51.18	51.90	52.37	51.82
Kontrola	0.420	0.422	0.422	0.00				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					77.07	77.04	75.88	76.66 ±0.68
<i>P. holosteu</i> m, Dimitrovgrad								
3.31	0.354	0.361	0.356	0.00	-0.37	-2.35	-0.94	-1.22
6.62	0.352	0.343	0.351	0.00	0.20	2.75	0.48	1.14
19.87	0.325	0.310	0.303	0.00	7.85	12.11	14.09	11.35
33.11	0.257	0.277	0.199	0.00	27.13	21.46	43.58	30.72
52.98	0.221	0.201	0.196	0.00	37.34	43.01	44.43	41.59
66.23	0.172	0.173	0.147	0.00	51.23	50.95	58.32	53.50
79.47	0.159	0.154	0.137	0.00	54.92	56.34	61.16	57.47
Kontrola	0.340	0.363	0.353	0.34				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					60.51	65.54	57.74	61.26 ±3.95



Grafik 8.25. Zavisnost  
RSC $O_2^{\cdot-}$  - radna koncentracija  
ekstrakata  
*P. coronopus*, Čanj  
*P. coronopus*, Niš  
*P. holosteu*m, Dimitrovgrad

Tabela 8.33. Kapacitet „hvatanja“  $O_2^{\cdot -}$  radikala  
(*P. holosteu*m, Kopaonik; *P. lanceolata*, Bar; *P. lanceolata*, Fruška gora)

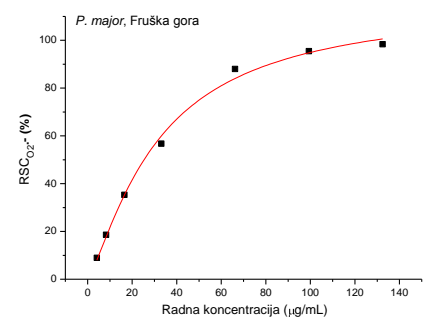
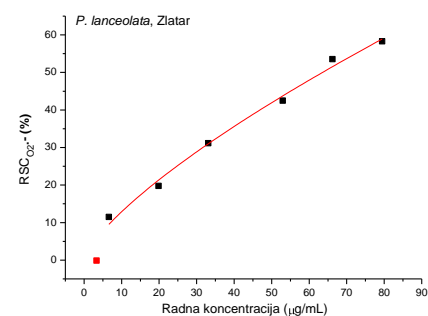
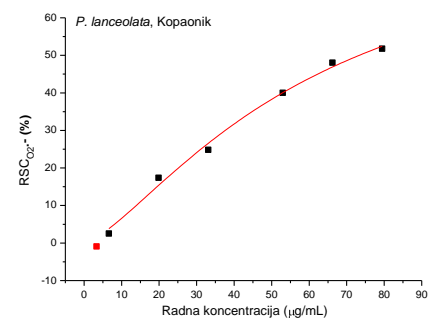
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC <sub>O<sub>2</sub>·</sub> (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>P. holosteu</i> m, Kopaonik								
3.31	0.370	0.353	0.354	0.00	-2.29	2.41	2.13	2.27
6.62	0.360	0.361	0.354	0.00	0.47	0.19	2.13	0.93
19.87	0.308	0.314	0.308	0.00	14.85	13.19	14.85	14.29
33.11	0.275	0.270	0.259	0.00	23.97	25.35	28.39	25.91
52.98	0.235	0.190	0.229	0.00	35.03	47.47	36.69	39.73
66.23	0.184	0.187	0.171	0.00	49.13	48.30	52.72	50.05
79.47	0.180	0.180	0.180	0.00	50.24	50.24	50.24	50.24
Kontrola	0.360	0.363	0.367	0.00				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					75.94	71.10	72.74	73.26 ±2.46
<i>P. lanceolata</i> , Bar								
3.31	0.281	0.296	0.297	0.00	0.71	-4.59	-4.95	-2.94
6.62	0.297	0.290	0.297	0.00	-4.95	-2.47	-4.95	-4.12
19.87	0.252	0.249	0.264	0.00	10.95	12.01	6.71	9.89
33.11	0.214	0.221	0.220	0.00	24.38	21.91	22.26	22.85
52.98	0.181	0.188	0.200	0.00	36.04	33.57	29.33	32.98
66.23	0.152	0.155	0.167	0.00	46.29	45.23	40.99	44.17
79.47	0.133	0.134	0.134	0.00	53.00	52.65	52.65	52.77
Kontrola	0.273	0.284	0.292					
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					73.79	75.02	77.11	75.31 ±1.68
<i>P. lanceolata</i> , Fruška gora								
4.14	0.315	0.321	0.314	0.011	9.17	7.38	9.47	8.67
8.28	0.285	0.297	0.283	0.011	18.14	14.55	18.73	17.14
16.56	0.239	0.246	0.225	0.011	31.88	29.79	36.06	32.58
33.11	0.134	0.138	0.142	0.009	62.65	61.46	60.26	61.46
66.23	0.036	0.032	0.034	0.011	92.53	93.73	93.13	93.13
99.34	0.028	0.031	0.030	0.012	95.22	94.32	94.62	94.72
132.45	0.032	0.032	0.031	0.015	94.92	94.92	95.22	95.02
Kontrola	0.330	0.333	0.338	0.00				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					23.66	24.72	23.18	23.85 ±0.79



Grafik 8.26. Zavisnost  
RSC $_{O_2^{\cdot -}}$  - radna koncentracija  
ekstrakata  
*P. holosteu*m, Kopaonik  
*P. lanceolata*, Bar  
*P. lanceolata*, Fruška gora

Tabela 8.34. Kapacitet „hvatanja“  $O_2^{\cdot-}$  radikala  
(*P. lanceolata*, Kopaonik; *P. lanceolata*, Zlatar; *P. major*, Fruška gora)

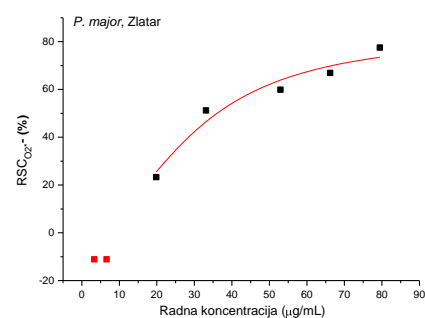
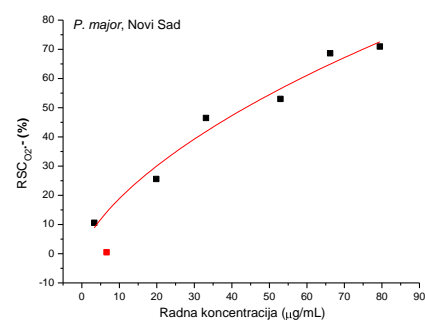
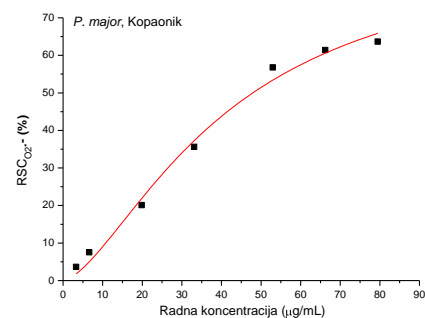
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC <sub>O<sub>2</sub>·</sub> (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>P. lanceolata</i> , Kopaonik								
3.31	0.352	0.358	0.364	0.00	0.76	-0.93	-2.62	-0.93
6.62	0.342	0.345	0.350	0.00	3.58	2.73	1.33	2.55
19.87	0.303	0.280	0.296	0.00	14.58	21.06	16.55	17.39
33.11	0.256	0.281	0.263	0.00	27.83	20.78	25.85	24.82
52.98	0.213	0.212	0.213	0.00	39.95	40.23	39.95	40.04
66.23	0.199	0.171	0.183	0.00	43.90	51.79	48.41	48.03
79.47	0.162	0.181	0.170	0.00	54.33	48.97	52.07	51.79
Kontrola	0.350	0.348	0.363	0.00				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					73.35	73.94	72.74	73.34 ±0.60
<i>P. lanceolata</i> , Zlatar								
3.31	0.309	0.297	0.301	0.00	-2.32	1.66	0.33	-0.11
6.62	0.265	0.264	0.273	0.00	12.25	12.58	9.60	11.48
19.87	0.249	0.249	0.229	0.00	17.55	17.55	24.17	19.76
33.11	0.213	0.206	0.205	0.00	29.47	31.79	32.12	31.13
52.98	0.169	0.175	0.177	0.00	44.04	42.05	41.39	42.49
66.23	0.146	0.135	0.140	0.00	51.66	55.30	53.64	53.53
79.47	0.120	0.124	0.134	0.00	60.26	58.94	55.63	58.28
Kontrola	0.300	0.307	0.298	0.00				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					63.22	62.38	64.18	63.26 ±0.9
<i>P. major</i> , Fruška gora								
4.14	0.290	0.311	0.306	0.007	12.74	6.26	7.80	8.93
8.28	0.275	0.274	0.264	0.007	17.36	17.67	20.75	18.59
16.56	0.204	0.223	0.226	0.008	39.56	33.70	32.78	35.35
33.11	0.164	0.157	0.127	0.009	52.20	54.36	63.61	56.73
66.23	0.051	0.060	0.039	0.011	87.67	84.89	91.37	87.97
99.34	0.025	0.025	0.027	0.011	95.68	95.68	95.07	95.48
132.45	0.020	0.019	0.019	0.014	98.15	98.46	98.46	98.36
Kontrola	0.340	0.314	0.323	0.00				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					25.75	27.19	24.15	25.70 ±1.52



Grafik 8.27. Zavisnost  
RSC $_{O_2^{\cdot-}}$  - radna koncentracija  
ekstrakata  
*P. lanceolata*, Kopaonik  
*P. lanceolata*, Zlatar  
*P. major*, Fruška gora

Tabela 8.35. Kapacitet „hvatanja“  $O_2^{\cdot -}$  radikala  
(*P. major*, Kopaonik; *P. major*, Novi Sad; *P. major*, Zlatar)

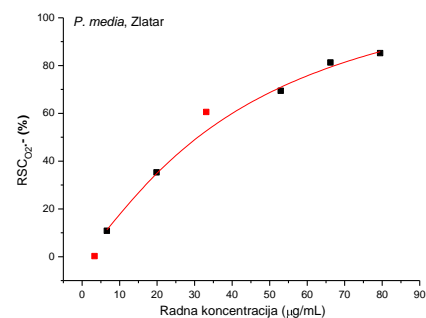
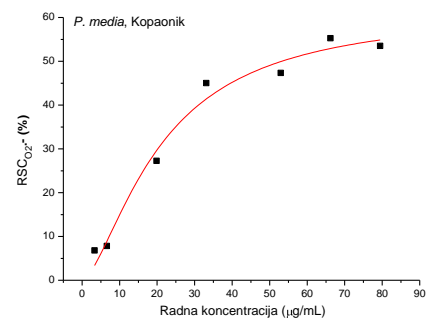
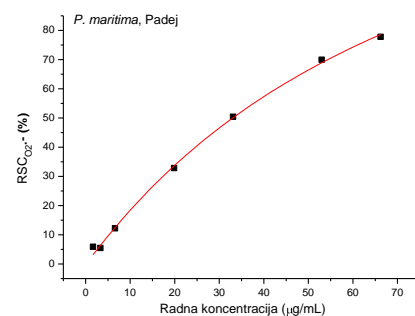
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC <sub>O<sub>2</sub>·</sub> (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>P. major</i> , Kopaonik								
3.31	0.402	0.396	0.390	0.00	2.19	3.65	5.11	3.65
6.62	0.376	0.379	0.385	0.00	8.52	7.79	6.33	7.54
19.87	0.329	0.329	0.327	0.00	19.95	19.95	20.44	20.11
33.11	0.246	0.270	0.278	0.00	40.15	34.31	32.36	35.60
52.98	0.166	0.182	0.185	0.00	59.61	55.72	54.99	56.77
66.23	0.159	0.165	0.152	0.00	61.31	59.85	63.02	61.39
79.47	0.155	0.165	0.128	0.00	62.29	59.85	68.86	63.67
Kontrola	0.412	0.411	0.413	0.00				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					47.44	50.11	49.01	48.85 ±1.34
<i>P. major</i> , Novi Sad								
3.31	0.276	0.284	0.252	0.00	8.82	6.18	16.75	10.58
6.62	0.289	0.277	0.338	0.00	4.53	8.49	-11.66	0.45
19.87	0.209	0.206	0.261	0.00	30.95	31.95	13.78	25.56
33.11	0.142	0.160	0.184	0.00	53.09	47.14	39.21	46.48
52.98	0.131	0.143	0.153	0.00	56.72	52.76	49.45	52.98
66.23	0.094	0.094	0.097	0.00	68.95	68.95	67.96	68.62
79.47	0.095	0.073	0.096	0.00	68.62	75.88	68.29	70.93
Kontrola	0.310	0.285	0.311	0.00				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					40.33	40.19	46.40	42.31 ±3.55
<i>P. major</i> , Zlatar								
3.31	0.132	0.132	0.146	0.00	-7.32	-7.32	-18.70	-11.11
6.62	0.132	0.133	0.145	0.00	-7.32	-8.13	-17.89	-11.11
19.87	0.084	0.093	0.106	0.00	31.71	24.39	13.82	23.31
33.11	0.058	0.061	0.061	0.00	52.85	50.41	50.41	51.22
52.98	0.049	0.052	0.047	0.00	60.16	57.72	61.79	59.89
66.23	0.041	0.042	0.039	0.00	66.67	65.85	68.29	66.94
79.47	0.027	0.029	0.027	0.00	78.05	76.42	78.05	77.51
Kontrola	0.140	0.117	0.116	0.00				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					35.22	37.78	34.75	35.92 ±1.63



Grafik 8.28. Zavisnost  
RSC $_{O_2^{\cdot -}}$  - radna  
koncentracija ekstrakta  
*P. major*,  
Kopaonik  
*P. major*, Novi Sad  
*P. major*, Zlatar

Tabela 8.36. Kapacitet „hvatanja“  $O_2^{\cdot-}$  radikala  
(*P. maritima*, Padej; *P. media*, Kopaonik; *P. media*, Zlatar)

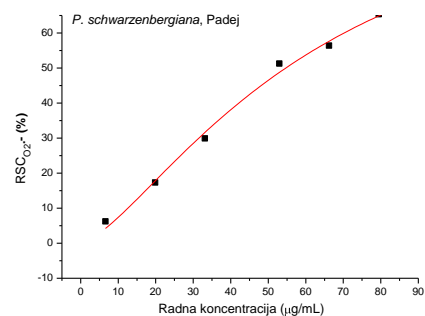
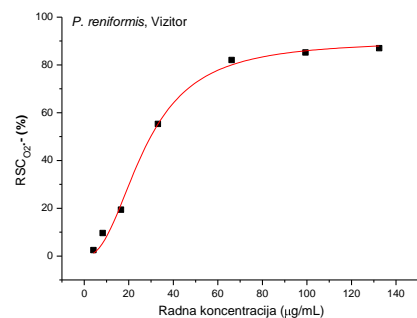
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC <sub>O<sub>2</sub>·</sub> (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>P. maritima</i> , Padej								
1.66	0.236	0.214	0.220	0.00	0.55	9.82	7.29	5.89
3.31	0.228	0.219	0.226	0.00	3.92	7.71	4.76	5.46
6.62	0.219	0.212	0.194	0.00	7.71	10.66	18.25	12.21
19.87	0.176	0.151	0.151	0.00	25.83	36.37	36.37	32.86
33.11	0.125	0.119	0.109	0.00	47.32	49.85	54.07	50.41
52.98	0.066	0.070	0.078	0.00	72.19	70.50	67.13	69.94
66.23	0.056	0.055	0.047	0.00	76.40	76.82	80.19	77.81
Kontrola	0.240	0.237	0.236	0.24				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					34.83	32.47	32.39	33.23 ±1.39
<i>P. media</i> , Kopaonik								
3.31	0.357	0.307	0.348	0.00	1.38	15.19	3.87	6.81
6.62	0.349	0.326	0.326	0.00	3.59	9.94	9.94	7.83
19.87	0.282	0.232	0.276	0.00	22.10	35.91	23.76	27.26
33.11	0.190	0.188	0.219	0.00	47.51	48.07	39.50	45.03
52.98	0.197	0.174	0.201	0.00	45.58	51.93	44.48	47.33
66.23	0.153	0.153	0.180	0.00	57.73	57.73	50.28	55.25
79.47	0.178	0.168	0.159	0.00	50.83	53.59	56.08	53.50
Kontrola	0.367	0.355	0.364	0.00				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					58.51	51.82	58.26	56.20 ±3.79
<i>P. media</i> , Zlatar								
3.31	0.169	0.165	0.172	0.00	0.00	2.37	-1.78	0.20
6.62	0.144	0.151	0.157	0.00	14.79	10.65	7.10	10.85
19.87	0.107	0.112	0.109	0.00	36.69	33.73	35.50	35.31
33.11	0.058	0.067	0.075	0.00	65.68	60.36	55.62	60.55
52.98	0.047	0.060	0.048	0.00	72.19	64.50	71.60	69.43
66.23	0.033	0.029	0.033	0.00	80.47	82.84	80.47	81.26
79.47	0.025	0.026	0.024	0.00	85.21	84.62	85.80	85.21
Kontrola	0.166	0.169	0.172					
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					28.51	29.12	29.19	28.94 ±0.37



Grafik 8.29. Zavisnost  
RSC $O_2^{\cdot-}$  - radna koncentracija  
ekstrakata  
*P. maritima*, Padej  
*P. media*, Kopaonik  
*P. media*, Zlatar

Tabela 8.37. Kapacitet „hvatanja“  $O_2^{\cdot -}$  radikala  
(*P. reniformis*, Vizitor; *P. schwarzenbergiana*, Padej; BHA; BHT)

Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				RSC <sub>O<sub>2</sub>·</sub> (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>P. reniformis</i> , Vizitor								
4.14	0.339	0.334	0.329	0.004	0.98	2.45	3.93	2.45
8.28	0.321	0.312	0.299	0.005	6.59	9.25	13.09	9.65
16.56	0.289	0.278	0.266	0.005	16.05	19.30	22.85	19.40
33.11	0.163	0.155	0.154	0.006	53.59	55.96	56.25	55.27
66.23	0.066	0.070	0.067	0.007	82.56	81.38	82.26	82.07
99.34	0.056	0.057	0.058	0.007	85.52	85.22	84.92	85.22
132.45	0.057	0.056	0.055	0.012	86.70	86.99	87.29	86.99
Kontrola	0.336	0.342	0.337	0.00				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					30.17	29.71	28.82	29.57 ±0.69
<i>P. schwarzenbergiana</i> , Padej								
6.62	0.228	0.237	0.228	0.00	7.43	3.78	7.43	6.21
19.87	0.198	0.207	0.206	0.00	19.61	15.96	16.36	17.31
33.11	0.168	0.178	0.172	0.00	31.79	27.73	30.17	29.90
52.98	0.119	0.122	0.119	0.00	51.68	50.47	51.68	51.28
66.23	0.109	0.107	0.106	0.00	55.75	56.56	56.96	56.42
79.47	0.078	0.092	0.086	0.00	68.33	62.65	65.08	65.35
99.34	0.059	0.072	0.069	0.00	76.05	70.77	71.99	72.93
Kontrola	0.246	0.248	0.245	0.00				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					53.99	55.57	54.26	54.61 ±0.85
BHA								
Nije aktivan u opsegu radne koncentracije 2.5-40 µg/mL								
BHT								
Nije aktivan u opsegu radne koncentracije 2.5-40 µg/mL								



Grafik 8.30. Zavisnost  
RSC $_{O_2^{\cdot -}}$  - radna koncentracija  
ekstrakata  
*P. reniformis*, Vizitor  
*P. schwarzenbergiana*,  
Padej

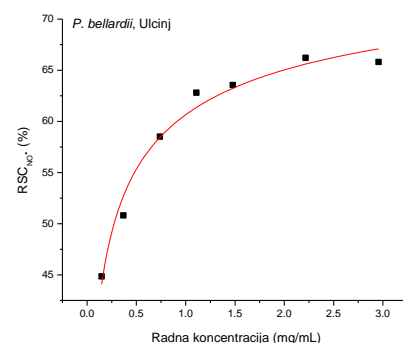
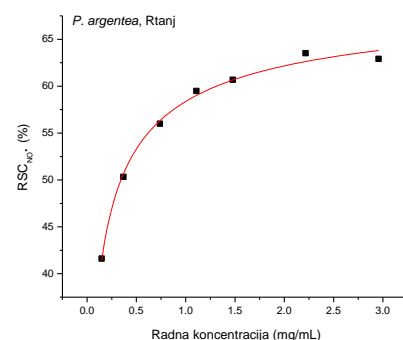
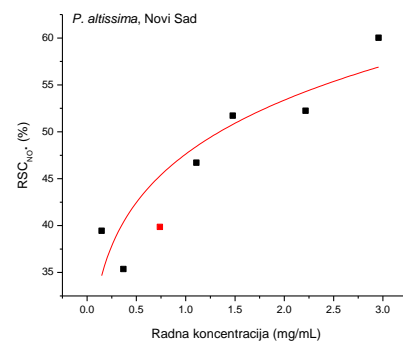


### 8.2.4. Kapacitet „hvatanja“ NO<sup>•</sup> radikala

Tabela 8.38. Kapacitet „hvatanja“ NO<sup>•</sup> radikala

(P. altissima, Novi Sad; P. argentea, Rtanj; P. bellardii, Ulcinj)

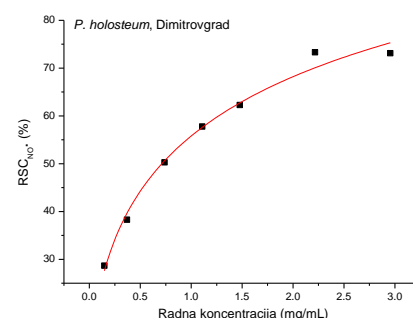
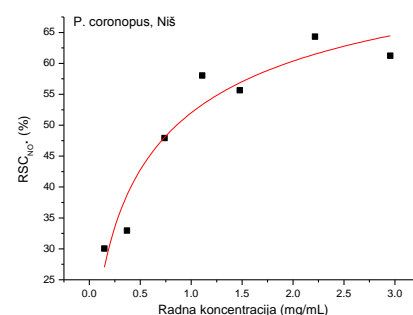
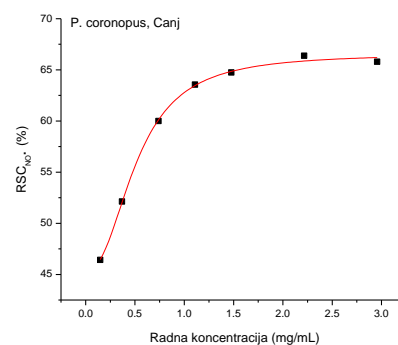
Radna konc. (mg/mL)	Apsorbancija				RSC <sub>NO•</sub> (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>P. altissima</i> , Novi Sad								
0.15	0.143	0.210	0.157	0.017	50.39	23.41	44.44	39.45
0.37	0.177	0.167	0.203	0.019	37.80	41.27	26.98	35.36
0.74	0.185	0.176	0.188	0.031	39.37	42.46	37.70	39.85
1.11	0.190	0.170	0.164	0.040	40.94	48.41	50.79	46.71
1.48	0.177	0.172	0.170	0.051	50.39	51.98	52.78	51.72
2.22	0.191	0.208	0.191	0.076	54.72	47.62	54.37	52.25
2.96	0.190	0.190	0.190	0.089	60.24	59.92	59.92	60.03
Kontrola	0.254	0.252	0.252	0.000				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)					1.49	1.30	1.39	1.39±0.1
<i>P. argentea</i> , Rtanj								
0.15	0.328	0.321	0.342	0.007	40.77	41.96	42.04	41.60
0.37	0.278	0.273	0.310	0.012	50.92	51.76	48.44	50.33
0.74	0.255	0.256	0.280	0.020	56.64	56.38	55.02	55.99
1.11	0.243	0.244	0.273	0.029	60.52	60.26	57.79	59.48
1.48	0.242	0.249	0.270	0.036	61.99	60.63	59.52	60.69
2.22	0.249	0.249	0.264	0.052	63.65	63.59	63.32	63.52
2.96	0.267	0.269	0.281	0.067	63.10	62.66	62.98	62.92
Kontrola	0.542	0.541	0.578	0.00				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)					0.33	0.31	0.37	0.34±0.03
<i>P. bellardii</i> , Ulcinj								
0.15	0.321	0.321	0.343	0.011	45.04	46.46	43.05	44.84
0.37	0.296	0.294	0.313	0.018	50.71	52.33	49.40	50.81
0.74	0.271	0.270	0.280	0.035	58.16	59.41	57.98	58.51
1.11	0.275	0.259	0.282	0.058	61.52	65.28	61.58	62.80
1.48	0.281	0.279	0.291	0.074	63.30	64.59	62.78	63.56
2.22	0.311	0.311	0.309	0.116	65.43	66.32	66.90	66.22
2.96	0.357	0.354	0.353	0.158	64.72	66.15	66.55	65.81
Kontrola	0.564	0.579	0.583	0.000				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)					0.27	0.29	0.29	0.28±0.01



Grafik 8.31. Zavisnost RSC<sub>NO•</sub> - radna koncentracija ekstrakata  
*P. altissima*, Novi Sad  
*P. argentea*, Rtanj  
*P. bellardii*, Ulcinj

Tabela 8.39. Kapacitet „hvatanja“ NO<sup>•</sup> radikala  
(*P. coronopus*, Čanj; *P. coronopus*, Niš; *P. holosteum*, Dimitrovgrad)

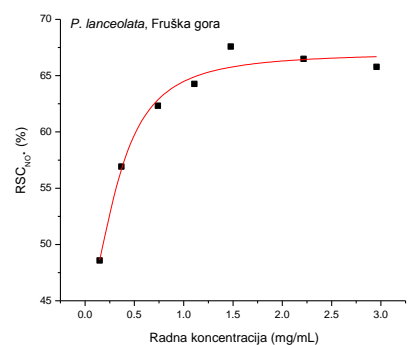
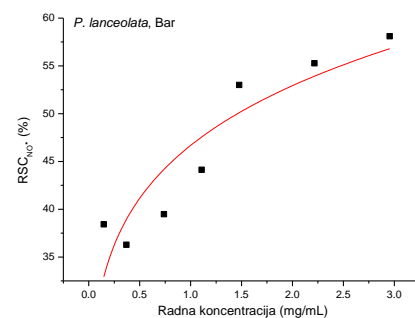
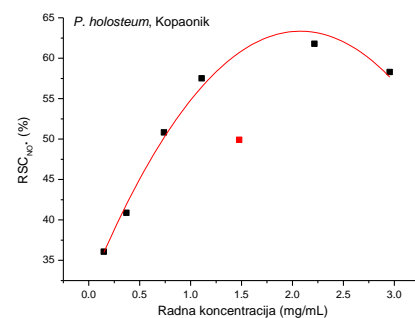
Radna konc. (mg/mL)	Apsorbancija				RSC <sub>NO•</sub> (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>P. coronopus</i> , Čanj								
0.15	0.387	0.409	0.434	0.012	45.57	47.26	43.96	45.60
0.37	0.389	0.345	0.362	0.015	45.72	56.18	53.92	52.12
0.74	0.347	0.290	0.301	0.020	52.54	64.14	62.68	60.00
1.11	0.333	0.271	0.277	0.027	55.59	67.60	66.80	63.56
1.48	0.333	0.267	0.267	0.031	56.17	68.66	68.66	64.74
2.22	0.336	0.258	0.267	0.041	57.18	71.18	69.99	66.38
2.96	0.353	0.268	0.268	0.046	55.44	70.52	70.52	65.79
Kontrola	0.689	0.753	0.753	0.000				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)					0.31	0.16	0.28	0.30 ±0.02
<i>P. coronopus</i> , Niš								
0.15	0.504	0.454	0.436	0.064	23.17	31.90	35.04	30.04
0.37	0.494	0.435	0.415	0.064	24.92	35.22	38.71	32.95
0.74	0.439	0.397	0.395	0.112	42.90	50.24	50.58	47.91
1.11	0.398	0.339	0.350	0.122	51.81	62.11	60.19	58.04
1.48	0.391	0.340	0.355	0.108	50.58	59.49	56.87	55.65
2.22	0.355	0.319	0.341	0.134	61.41	67.70	63.86	64.32
2.96	0.353	0.342	0.340	0.123	59.84	61.76	62.11	61.24
Kontrola	0.633	0.537	0.548	0.00				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)					0.98	0.83	0.83	0.88 ±0.09
<i>P. holosteum</i> , Dimitrovgrad								
0.15	0.374	0.361	0.336	0.103	23.88	27.53	34.55	28.65
0.37	0.339	0.318	0.329	0.109	35.39	41.29	38.20	38.30
0.74	0.298	0.288	0.263	0.106	46.07	48.88	55.90	50.28
1.11	0.300	0.267	0.280	0.132	52.81	62.08	58.43	57.77
1.48	0.330	0.298	0.285	0.170	55.06	64.04	67.70	62.27
2.22	0.361	0.363	0.314	0.251	69.10	68.54	82.30	73.31
2.96	0.385	0.397	0.402	0.299	75.84	72.47	71.07	73.13
Kontrola	0.360	0.351	0.356	0.000				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)					0.87	0.69	0.83	0.80 ±0.09



Grafik 8.32. Zavisnost  
RSC<sub>NO•</sub> - radna koncentracija  
ekstrakata  
*P. coronopus*, Čanj  
*P. coronopus*, Niš  
*P. holosteum*, Dimitrovgrad

Tabela 8.40. Kapacitet „hvatanja“ NO<sup>•</sup> radikala  
(*P. holosteam*, Kopaonik; *P. lanceolata*, Bar; *P. lanceolata*, Fruška gora)

Radna konc. (mg/mL)	Apsorbancija				RSC <sub>NO•</sub> (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>P. holosteam</i> , Kopaonik								
0.15	0.531	0.544	0.507	0.088	35.54	33.65	39.04	36.08
0.37	0.528	0.485	0.491	0.095	37.00	43.26	42.38	40.88
0.74	0.487	0.481	0.475	0.143	49.95	50.82	51.70	50.82
1.11	0.466	0.463	0.439	0.164	56.06	56.50	59.99	57.51
1.48	0.571	0.513	0.441	0.164	40.78	49.22	59.70	49.90
2.22	0.561	0.557	0.501	0.277	58.68	59.26	67.41	61.78
2.96	0.609	0.610	0.556	0.305	55.77	55.62	63.48	58.29
Kontrola	0.724	0.677	0.661	0.000				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)					0.74	0.62	0.65	0.67 ±0.06
<i>P. lanceolata</i> , Bar								
0.15	0.486	0.451	0.440	0.017	34.65	39.53	41.06	38.41
0.37	0.504	0.472	0.456	0.020	32.56	37.02	39.25	36.28
0.74	0.506	0.444	0.443	0.030	33.68	42.32	42.46	39.48
1.11	0.453	0.436	0.419	0.035	41.76	44.13	46.50	44.13
1.48	0.435	0.390	0.388	0.067	48.73	55.00	55.27	53.00
2.22	0.412	0.367	0.367	0.061	51.09	57.36	57.36	55.27
2.96	0.395	0.370	0.368	0.077	55.69	59.18	59.45	58.11
Kontrola	0.809	0.704	0.640	0.000				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)					1.69	1.34	1.34	1.46 ±0.02
<i>P. lanceolata</i> , Fruška gora								
0.15	0.393	0.387	0.377	0.393	46.87	48.74	48.41	48.01
0.37	0.338	0.315	0.316	0.338	54.70	58.80	57.23	56.92
0.74	0.317	0.285	0.283	0.317	59.12	64.39	63.44	62.32
1.11	0.310	0.287	0.277	0.310	61.54	65.50	65.75	64.26
1.48	0.313	0.288	0.284	0.313	64.96	69.13	68.64	67.58
2.22	0.331	0.297	0.292	0.331	62.96	68.44	68.06	66.49
2.96	0.341	0.323	0.307	0.341	63.25	66.48	67.63	65.78
Kontrola	0.702	0.716	0.692	0.702				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)					0.21	0.17	0.18	0.19 ±0.02

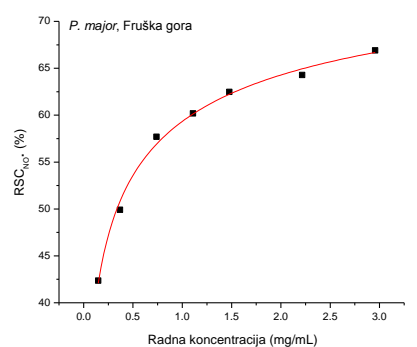
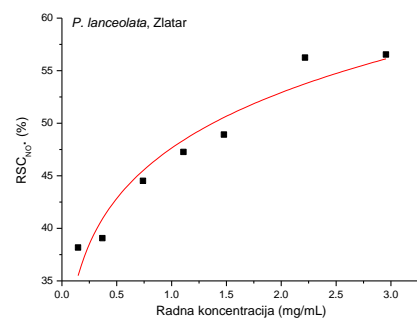
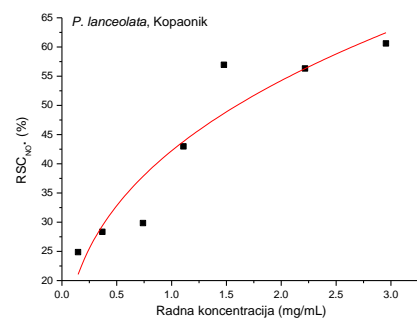


Grafik 8.33. Zavisnost  
RSC<sub>NO•</sub> - radna koncentracija  
ekstrakata  
*P. holosteam*, Kopaonik  
*P. lanceolata*, Bar  
*P. lanceolata*, Fruška gora

Tabela 8.41. Kapacitet „hvatanja“ NO<sup>•</sup> radikala

(P. lanceolata, Kopaonik; P. lanceolata, Zlatar; P. major, Fruška gora)

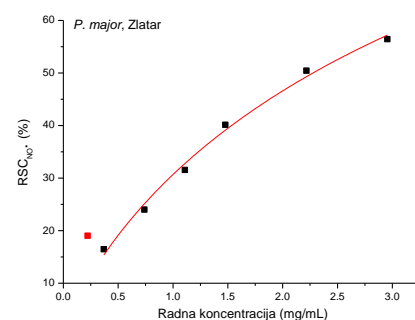
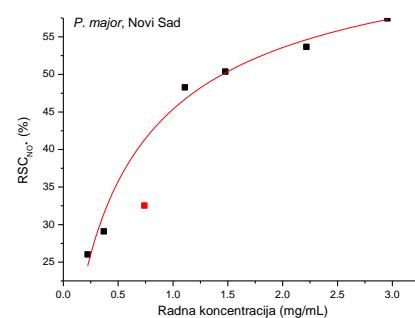
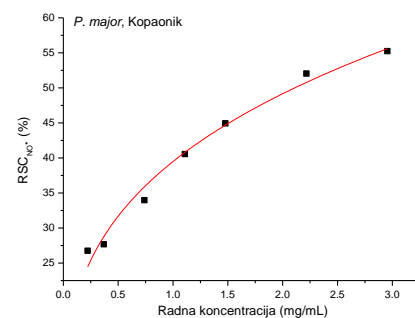
Radna konc. (mg/mL)	Apsorbancija				RSC <sub>NO•</sub> (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>P. lanceolata</i> , Kopaonik								
0.15	0.356	0.366	0.422	0.019	30.13	28.05	16.44	24.87
0.37	0.347	0.351	0.396	0.019	31.99	31.16	21.83	28.33
0.74	0.347	0.350	0.399	0.027	33.65	33.03	22.87	29.85
1.11	0.316	0.316	0.316	0.041	42.98	42.98	42.98	42.98
1.48	0.342	0.286	0.322	0.109	51.69	63.30	55.84	56.94
2.22	0.288	0.280	0.334	0.090	58.95	60.61	49.41	56.32
2.96	0.306	0.308	0.310	0.118	61.02	60.61	60.19	60.61
Kontrola	0.415	0.463	0.569	0.000				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)					1.52	1.57	1.60	1.56 ±0.04
<i>P. lanceolata</i> , Zlatar								
0.15	0.372	0.374	0.401	0.031	40.00	39.64	34.89	38.18
0.37	0.370	0.371	0.391	0.031	40.35	40.17	36.65	39.06
0.74	0.335	0.339	0.365	0.031	46.51	45.80	41.23	44.51
1.11	0.326	0.314	0.352	0.031	48.09	50.20	43.52	47.27
1.48	0.332	0.309	0.338	0.036	47.91	51.96	46.86	48.91
2.22	0.294	0.300	0.317	0.055	57.94	56.89	53.90	56.24
2.96	0.312	0.308	0.322	0.067	56.89	57.59	55.13	56.54
Kontrola	0.546	0.561	0.598	0.000				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)					1.42	1.16	1.51	1.36 ±0.18
<i>P. major</i> , Fruška gora								
0.15	0.394	0.363	0.362	0.012	39.84	43.93	43.37	42.36
0.37	0.346	0.327	0.319	0.017	48.19	50.48	51.13	49.92
0.74	0.309	0.274	0.272	0.020	54.49	59.42	59.22	57.69
1.11	0.302	0.262	0.259	0.025	56.38	62.14	62.14	60.19
1.48	0.292	0.249	0.254	0.030	58.74	65.02	63.75	62.48
2.22	0.292	0.255	0.250	0.042	60.63	65.97	66.34	64.29
2.96	0.257	0.257	0.258	0.050	67.40	66.93	66.34	66.90
Kontrola	0.635	0.626	0.618	0.000				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)					0.42	0.3	0.29	0.34 ±0.07



Grafik 8.34. Zavisnost RSC<sub>NO•</sub> - radna koncentracija ekstrakata  
*P. lanceolata*, Kopaonik  
*P. lanceolata*, Zlatar  
*P. major*, Fruška gora

Tabela 8.42. Kapacitet „hvatanja“ NO<sup>•</sup> radikala  
(*P. major*, Kopaonik; *P. major*, Novi Sad; *P. major*, Zlatar)

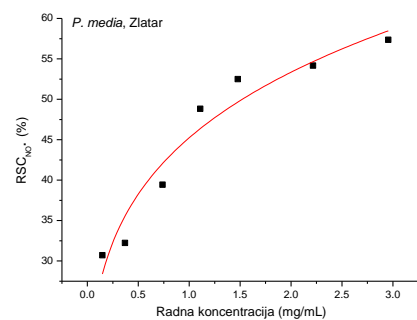
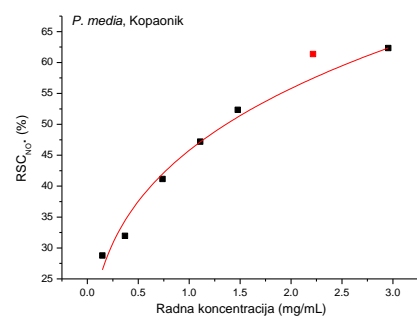
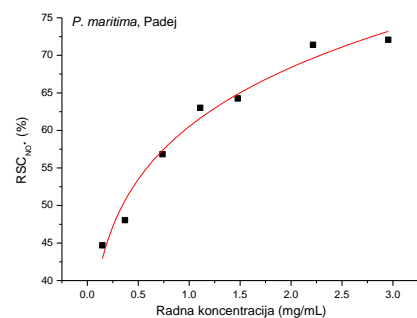
Radna konc. (mg/mL)	Apsorbancija				RSC <sub>NO•</sub> (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>P. major</i> , Kopaonik								
0.22	0.440	0.437	0.464	0.020	27.96	28.47	23.84	26.76
0.37	0.445	0.460	0.477	0.039	30.36	27.79	24.87	27.67
0.74	0.406	0.422	0.450	0.041	37.39	34.65	29.85	33.96
1.11	0.368	0.392	0.427	0.049	45.28	41.17	35.16	40.54
1.48	0.351	0.365	0.397	0.050	48.37	45.97	40.48	44.94
2.22	0.339	0.346	0.364	0.070	53.86	52.66	49.57	52.03
2.96	0.338	0.348	0.358	0.087	56.95	55.23	53.52	55.23
Kontrola	0.648	0.532	0.569	0.000				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)					1.84	2.05	2.38	2.09 ±0.27
<i>P. major</i> , Novi Sad								
0.22	0.415	0.547	0.533	0.055	39.93	17.90	20.24	26.02
0.37	0.403	0.521	0.519	0.056	42.10	22.41	22.74	29.08
0.74	0.447	0.437	0.521	0.064	36.09	37.76	23.74	32.53
1.11	0.421	0.356	0.390	0.079	42.93	53.78	48.11	48.27
1.48	0.345	0.398	0.449	0.100	59.12	50.28	41.77	50.39
2.22	0.411	0.369	0.482	0.143	55.28	62.29	43.43	53.67
2.96	0.405	0.400	0.407	0.149	57.28	58.12	56.95	57.45
Kontrola	0.549	0.542	0.707	0.000				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)					1.39	1.38	1.57	1.45 ±0.11
<i>P. major</i> , Zlatar								
0.22	0.439	0.491	0.437	0.019	27.96	19.04	28.30	25.10
0.37	0.422	0.499	0.460	0.012	29.67	16.47	23.16	23.10
0.74	0.384	0.462	0.422	0.019	37.39	24.01	30.87	30.76
1.11	0.357	0.425	0.392	0.026	43.22	31.56	37.22	37.34
1.48	0.322	0.386	0.365	0.037	51.11	40.14	43.74	45.00
2.22	0.290	0.336	0.346	0.047	58.32	50.43	48.71	52.49
2.96	0.315	0.320	0.348	0.066	57.29	56.43	51.63	55.12
Kontrola	0.565	0.622	0.690	0.000				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)					1.87	2.28	2.33	2.16 ±0.25



Grafik 8.35. Zavisnost  
RSC<sub>NO<sup>•</sup></sub> - radna koncentracija  
ekstrakata  
*P. major*, Kopaonik  
*P. major*, Novi Sad  
*P. major*, Zlatar

Tabela 8.43. Kapacitet „hvatanja“ NO<sup>•</sup> radikala  
(*P. maritima*, Padej; *P. media*, Kopaonik; *P. media*, Zlatar)

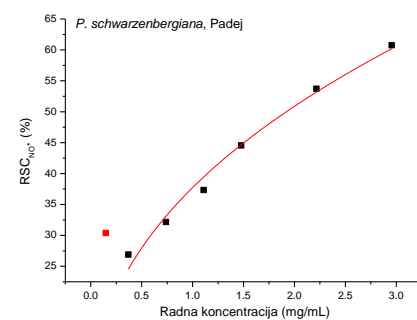
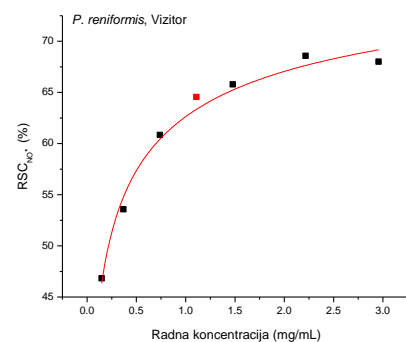
Radna konc. (mg/mL)	Apsorbancija				RSC <sub>NO•</sub> (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>P. maritima</i> , Padej								
0.15	0.578	0.539	0.517	0.101	40.52	45.39	48.13	44.68
0.37	0.572	0.513	0.489	0.108	42.14	49.50	52.49	48.05
0.74	0.497	0.447	0.461	0.122	53.24	59.48	57.73	56.82
1.11	0.461	0.405	0.381	0.119	57.36	64.34	67.33	63.01
1.48	0.434	0.389	0.382	0.115	60.22	65.84	66.71	64.26
2.22	0.412	0.385	0.377	0.162	68.83	72.19	73.19	71.40
2.96	0.393	0.407	0.382	0.170	72.19	70.45	73.57	72.07
Kontrola	0.909	0.780	0.717	0.000				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)					0.58	0.37	0.29	0.33 ±0.06
<i>P. media</i> , Kopaonik								
0.15	0.416	0.420	0.408	0.073	28.50	27.66	30.16	28.77
0.37	0.420	0.361	0.411	0.071	27.25	39.55	29.12	31.97
0.74	0.381	0.332	0.380	0.082	37.67	47.88	37.88	41.14
1.11	0.365	0.324	0.344	0.091	42.88	51.43	47.26	47.19
1.48	0.344	0.297	0.321	0.092	47.47	57.26	52.26	52.33
2.22	0.329	0.283	0.307	0.121	56.64	66.23	61.23	61.36
2.96	0.338	0.266	0.292	0.118	54.14	69.15	63.73	62.34
Kontrola	0.467	0.458	0.514					
IC <sub>50</sub> (mg/mL)					1.62	0.89	1.34	1.48 ±0.20
<i>P. media</i> , Zlatar								
0.15	0.431	0.425	0.436	0.084	30.64	31.84	29.64	30.71
0.37	0.422	0.414	0.427	0.082	32.04	33.64	31.04	32.24
0.74	0.390	0.382	0.395	0.086	39.24	40.84	38.24	39.44
1.11	0.358	0.364	0.358	0.104	49.23	48.03	49.23	48.83
1.48	0.364	0.362	0.353	0.122	51.63	52.03	53.83	52.50
2.22	0.369	0.408	0.391	0.160	58.23	50.43	53.83	54.16
2.96	0.412	0.418	0.428	0.206	58.82	57.63	55.63	57.36
Kontrola	0.493	0.490	0.518	0.000				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)					1.45	1.61	1.54	1.53 ±0.08



Grafik 8.36. Zavisnost  
RSC<sub>NO•</sub> - radna koncentracija  
ekstrakata  
*P. maritima*, Padej  
*P. media*, Kopaonik  
*P. media*, Zlatar

Tabela 8.44. Kapacitet „hvatanja“ NO<sup>•</sup> radikala  
(*P. reniformis*, Vizitor; *P. schwarzenbergiana*, Padej; BHA, BHT)

Radna konc. (mg/mL)	Apsorbancija				RSC <sub>NO•</sub> (%)			Srednja vrednost
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	RSC-1	RSC-2	RSC-3	
<i>P. reniformis</i> , Vizitor								
0.15	0.364	0.355	0.352	0.013	48.31	46.14	45.93	46.83
0.37	0.318	0.307	0.324	0.016	55.52	54.17	50.88	53.58
0.74	0.280	0.271	0.275	0.022	62.00	60.79	59.65	60.84
1.11	0.267	0.249	0.262	0.030	65.10	65.51	63.00	64.55
1.48	0.274	0.246	0.255	0.037	65.10	67.09	65.23	65.79
2.22	0.264	0.246	0.250	0.050	68.48	69.13	68.10	68.57
2.96	0.286	0.260	0.258	0.061	66.86	68.66	68.58	68.01
Kontrola	0.679	0.635	0.627	0.000				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)					0.19	0.22	0.23	0.21 ±0.02
<i>P. schwarzenbergiana</i> , Padej								
0.15	0.449	0.416	0.394	0.007	25.43	30.99	34.71	25.43
0.37	0.477	0.425	0.413	0.005	20.36	29.14	31.16	20.36
0.74	0.462	0.390	0.390	0.012	24.08	36.22	36.22	24.08
1.11	0.435	0.378	0.355	0.018	29.64	39.26	43.14	29.64
1.48	0.397	0.340	0.327	0.026	37.41	47.02	49.22	37.41
2.22	0.332	0.312	0.290	0.037	50.23	53.60	57.31	50.23
2.96	0.292	0.284	0.263	0.047	58.66	60.01	63.56	58.66
Kontrola	0.673	0.582	0.523	0.000				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)					2.26	1.83	1.56	2.05 ±0.30
BHA								
Nije aktivan u opsegu radne koncentracije 0.1-3.0 mg/mL								
BHT								
Nije aktivan u opsegu radne koncentracije 0.1-3.0 mg/mL								

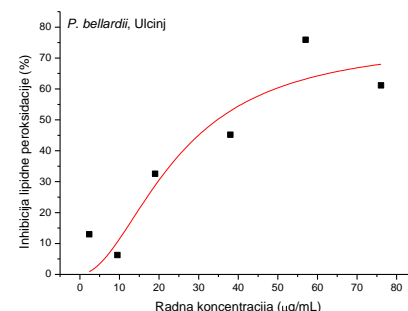
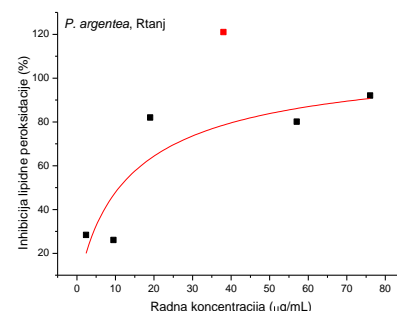
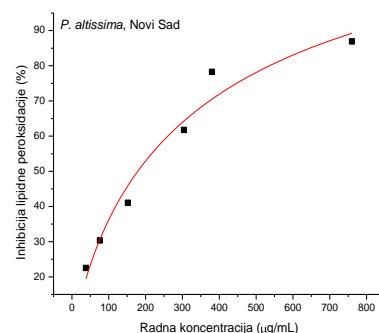


Grafik 8.37. Zavisnost  
RSC<sub>NO•</sub> - radna koncentracija  
ekstrakata  
*P. reniformis*, Vizitor  
*P. schwarzenbergiana*,  
Padej

### 8.2.5. Inhibicija lipidne peroksidacije

Tabela 8.45. Inhibicija lipidne peroksidacije  
(*P. altissima*, Novi Sad; *P. argentea*, Rtanj; *P. bellardii*, Ulcinj)

Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				Inhibicija lipidne peroksidacije (%)			Srednja vrednost inhibicije
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	I-1	I-2	I-3	
<i>P. altissima</i> , Novi Sad								
38.02	0.217	0.216	0.198	0.071	18.87	19.30	29.42	22.53
76.05	0.234	0.244	0.229	0.110	31.34	25.83	33.86	30.34
152.09	0.264	0.272	0.259	0.159	41.41	37.32	44.34	41.02
304.18	0.344	0.323	0.341	0.268	57.39	69.03	58.86	61.76
380.23	0.338	0.347	0.333	0.300	79.07	73.84	81.92	78.28
760.46	0.460	0.460	0.438	0.429	82.90	82.86	94.98	86.91
Kontrola	0.217	0.229	0.204	0.037				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					183.0	183.38	166.7	177.71±9.50
<i>P. argentea</i> , Rtanj								
2.38	0.244	0.250	0.238	0.092	28.36	25.65	31.20	28.40
9.51	0.283	0.309	0.289	0.137	31.01	18.75	28.48	26.08
19.01	0.464	0.471	0.488	0.436	86.89	83.42	75.73	82.01
38.02	0.623	0.664	0.682	0.701	136.7	117.33	109.0	121.02
57.03	0.853	0.853	0.893	0.851	99.01	99.02	80.10	80.10
76.05	1.115	1.069	1.115	1.098	92.02	113.97	92.04	92.04
Kontrola	0.235	0.248	0.272	0.004				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					10.68	11.89	11.57	11.29±0.63
<i>P. bellardii</i> , Ulcinj								
2.38	0.320	0.356	0.316	0.057	16.45	4.82	17.64	12.97
9.51	0.342	0.334	0.368	0.054	8.23	10.68	-0.11	9.45
19.01	0.345	0.296	0.302	0.103	22.75	38.27	36.59	32.54
38.02	0.305	0.305	0.310	0.135	45.96	45.95	44.37	45.16
57.03	0.328	0.281	0.259	0.214	63.63	78.64	85.48	75.92
76.05	0.287	0.374	0.373	0.165	61.13	33.29	33.74	61.14
Kontrola	0.378	0.358	0.325	0.04				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					39.98	35.41	34.89	35.15±0.37

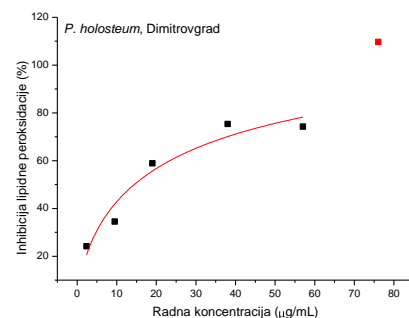
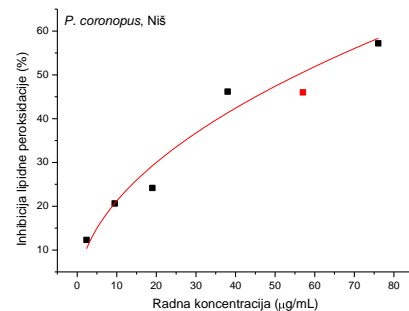
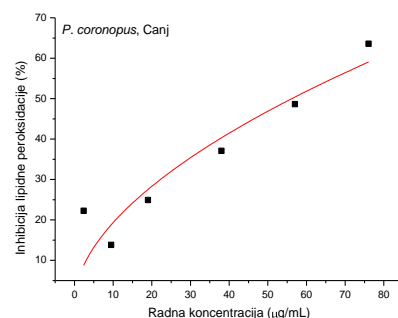


Grafik 8.38. Zavisnost I<sub>LP</sub> -  
radna koncentracija  
ekstrakata  
*P. altissima*, Novi Sad  
*P. argentea*, Rtanj  
*P. bellardii*, Ulcinj



Tabela 8.46. Inhibicija lipidne peroksidacije  
(*P. coronopus*, Čanj; *P. coronopus*, Niš; *P. holosteum*, Dimitrovgrad)

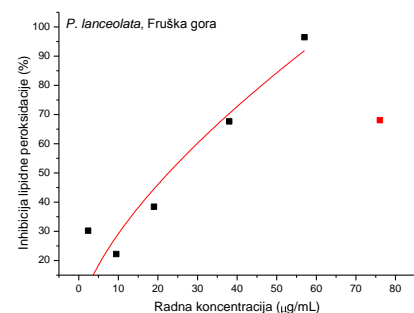
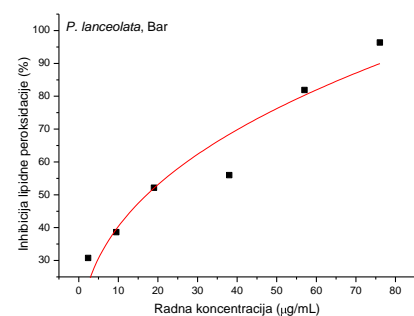
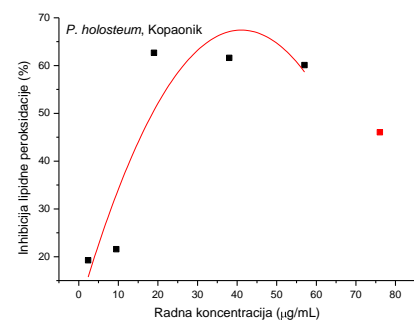
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				Inhibicija lipidne peroksidacije (%)			Srednja vrednost inhibicije
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	I-1	I-2	I-3	
<i>P. coronopus</i> , Čanj								
2.38	0.199	0.196	0.198	0.052	21.39	23.40	22.03	21.39
9.51	0.164	0.142	0.214	0.053	40.31	52.48	13.82	40.31
19.01	0.209	0.203	0.193	0.061	21.02	24.20	29.59	21.02
38.02	0.201	0.191	0.214	0.084	37.65	42.98	30.66	37.65
57.03	0.192	0.201	0.205	0.103	52.72	47.62	45.55	52.72
76.05	0.187	0.193	0.171	0.115	61.86	58.57	70.27	61.86
Kontrola	0.182	0.247	0.227	0.040				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					55.17	54.41	54.51	54.70±0.41
<i>P. coronopus</i> , Niš								
2.38	0.157	0.174	0.168	0.046	19.41	6.55	10.92	12.29
9.51	0.159	0.163	0.149	0.048	19.10	16.47	26.22	20.60
19.01	0.175	0.175	0.175	0.069	22.59	22.59	22.62	22.60
38.02	0.129	0.160	0.160	0.076	61.08	38.76	38.60	46.15
57.03	0.159	0.171	0.163	0.090	49.96	41.36	46.67	45.99
76.05	0.159	0.174	0.164	0.107	61.87	50.93	58.69	57.17
Kontrola	0.200	0.170	0.160	0.040				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					55.76	-	60.81	58.29±3.57
<i>P. holosteum</i> , Dimitrovgrad								
2.38	0.213	0.207	0.197	0.058	20.41	23.54	28.59	24.18
9.51	0.203	0.209	0.196	0.074	34.29	31.32	37.88	34.49
19.01	0.205	0.245	0.230	0.146	69.93	49.62	57.08	58.88
38.02	0.253	0.285	0.285	0.226	86.32	69.86	69.96	75.38
57.03	0.315	0.349	0.327	0.280	82.04	64.61	76.06	74.24
76.05	0.351	0.384	0.360	0.384	116.9	99.92	112.3	109.73
Kontrola	0.235	0.243	0.228	0.040				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					12.98	15.55	14.92	15.24±0.45



Grafik 8.39. Zavisnost I<sub>LP</sub> -  
radna koncentracija  
ekstrakata  
*P. coronopus*, Čanj  
*P. coronopus*, Niš  
*P. holosteum*, Dimitrovgrad

Tabela 8.47. Inhibicija lipidne peroksidacije  
(*P. holosteu*m, Kopaonik; *P. lanceolata*, Bar; *P. lanceolata*, Fruška gora)

Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				Inhibicija lipidne peroksidacije (%)			Srednja vrednost inhibicije
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	I-1	I-2	I-3	
P. holosteu <sup>m</sup> , Kopaonik								
2.38	0.234	0.243	0.234	0.061	20.57	16.58	20.57	19.24
9.51	0.205	0.276	0.225	0.064	35.41	3.05	26.26	21.57
19.01	0.236	0.262	0.260	0.171	70.38	58.29	59.30	62.65
38.02	0.253	0.293	0.284	0.193	72.25	54.34	58.21	61.60
57.03	0.273	0.317	0.331	0.220	75.72	55.42	49.11	60.08
76.05	0.329	0.413	0.390	0.260	68.38	29.65	40.11	46.05
Kontrola	0.240	0.294	0.241	0.040				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					17.76	11.31	18.72	18.24±0.24
P. lanceolata, Bar								
2.38	0.199	0.195	0.199	0.055	30.08	32.11	30.10	30.76
9.51	0.195	0.192	0.196	0.068	38.28	39.69	37.81	38.59
19.01	0.240	0.233	0.223	0.134	48.40	51.67	56.33	52.13
38.02	0.280	0.284	0.065	0.192	57.01	54.95	161.3	55.98
57.03	0.316	0.306	0.330	0.280	82.58	87.27	75.79	81.88
76.05	0.297	0.339	0.320	0.311	107.0	86.60	95.44	96.35
Kontrola	0.252	0.254	0.232	0.04				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					16.31	16.29	14.95	15.85±0.78
P. lanceolata, Fruška gora								
2.38	0.194	0.195	0.187	0.104	30.68	29.74	36.49	30.21
9.51	0.185	0.188	0.199	0.085	23.53	20.89	12.90	22.22
19.01	0.236	0.252	0.230	0.159	40.99	28.96	45.32	38.42
38.02	0.295	0.306	0.297	0.257	70.99	62.49	69.40	67.63
57.03	0.350	0.365	0.367	0.356	104.5	93.13	91.77	92.45
76.05	0.414	0.416	0.410	0.372	67.64	65.70	70.87	68.07
Kontrola	0.176	0.170	0.165	0.040				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					25.45	26.21	22.83	24.83±1.77

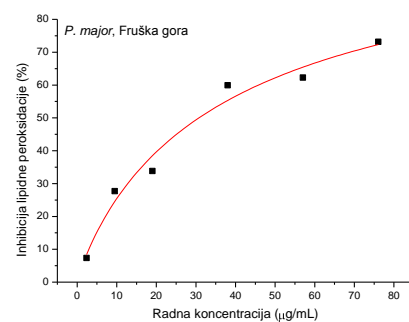
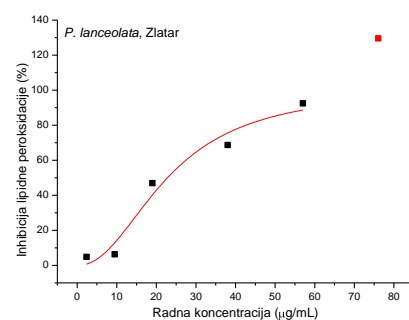
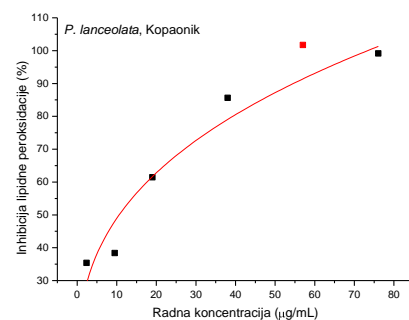


Grafik 8.40. Zavisnost I<sub>LP</sub> - radna koncentracija ekstrakata  
*P. holosteu*m, Kopaonik  
*P. lanceolata*, Bar  
*P. lanceolata*, Fruška gora

Tabela 8.48. Inhibicija lipidne peroksidacije

(P. lanceolata, Kopaonik; P. lanceolata, Zlatar; P. major, Fruška gora)

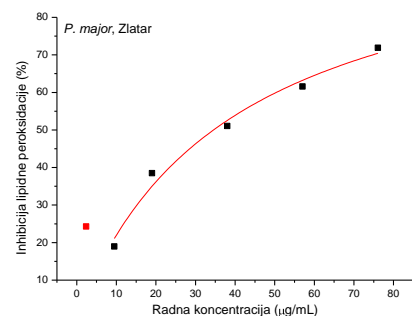
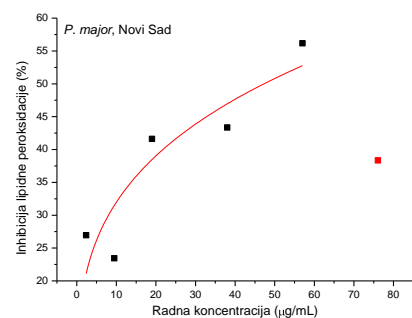
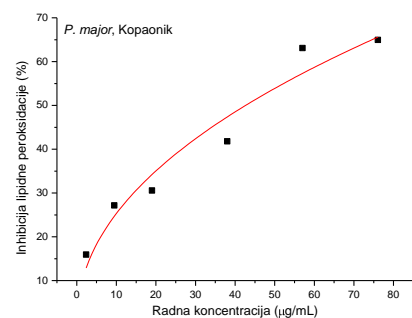
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				Inhibicija lipidne peroksidacije (%)			Srednja vrednost inhibicije
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	I-1	I-2	I-3	
P. lanceolata, Kopaonik								
2.38	0.188	0.198	0.187	0.062	37.18	31.74	37.20	35.37
9.51	0.183	0.219	0.193	0.076	46.07	28.16	40.92	38.38
19.01	0.224	0.247	0.266	0.169	72.16	60.85	51.31	61.44
38.02	0.252	0.282	0.301	0.250	98.93	83.63	74.28	85.61
57.03	0.311	0.335	0.332	0.337	112.9	100.94	102.5	101.74
76.05	0.388	0.375	0.393	0.384	97.77	104.31	95.29	99.12
Kontrola	0.220	0.281	0.216	0.040				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					11.65	13.03	12.55	12.41±0.70
P. lanceolata, Zlatar								
2.38	0.231	0.249	0.202	0.084	-6.52	-8.06	4.85	4.85
9.51	0.233	0.178	0.215	0.070	4.06	29.08	22.86	6.28
19.01	0.294	0.243	0.242	0.179	24.23	57.68	58.83	46.92
38.02	0.354	0.328	0.333	0.291	58.25	75.30	72.46	68.67
57.03	0.370	0.362	0.360	0.350	87.05	91.78	93.04	92.45
76.05	0.404	0.431	0.410	0.460	136.7 5	119.11	132.9 4	129.60
Kontrola	0.182	0.214	0.181	0.040				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					32.88	16.25	17.63	16.94±0.98
P. major, Fruška gora								
2.38	0.248	0.215	0.193	0.048	-8.59	9.53	21.16	15.34
9.51	0.146	0.172	0.196	0.051	48.36	34.10	21.28	27.69
19.01	0.221	0.175	0.190	0.061	13.17	38.13	29.49	33.81
38.02	0.155	0.169	0.175	0.093	65.88	58.72	55.22	59.94
57.03	0.164	0.152	0.170	0.092	61.36	67.80	57.69	62.29
76.05	0.172	0.178	0.186	0.129	76.99	73.50	69.01	73.16
Kontrola	0.241	0.212	0.220	0.040				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					31.09	29.83	33.34	31.42±1.78



Grafik 8.41. Zavisnost I<sub>LP</sub> - radna koncentracija ekstrakata  
*P. lanceolata*, Kopaonik  
*P. lanceolata*, Zlatar  
*P. major*, Fruška gora

Tabela 8.49. Inhibicija lipidne peroksidacije  
(*P. major*, Kopaonik; *P. major*, Novi Sad; *P. major*, Zlatar)

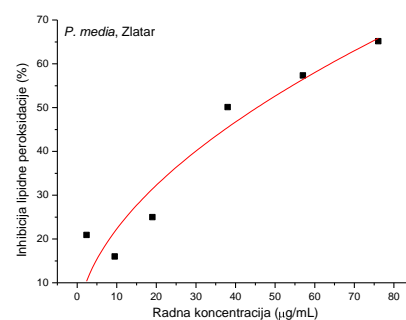
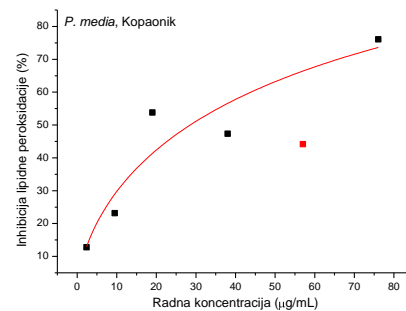
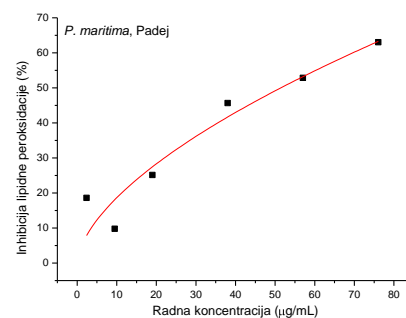
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				Inhibicija lipidne peroksidacije (%)			
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
P. major, Kopaonik								
2.38	0.258	0.268	0.296	0.053	22.07	18.17	7.58	22.07
9.51	0.237	0.257	0.244	0.055	30.52	23.05	27.86	30.52
19.01	0.265	0.254	0.276	0.083	30.52	34.76	26.39	30.52
38.02	0.290	0.270	0.264	0.122	36.05	43.55	45.76	36.05
57.03	0.272	0.242	0.247	0.157	56.10	67.39	65.75	56.10
76.05	0.257	0.267	0.247	0.165	64.90	61.22	68.74	64.90
Kontrola	0.276	0.295	0.336	0.04				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					41.42	41.21	41.17	41.27±0.13
P. major, Novi Sad								
2.38	0.282	0.278	0.289	0.049	27.22	28.62	25.00	27.22
9.51	0.279	0.293	0.316	0.050	28.80	24.45	17.09	28.80
19.01	0.255	0.257	0.272	0.074	43.58	43.00	38.26	43.58
38.02	0.278	0.269	0.281	0.094	42.73	45.50	41.82	42.73
57.03	0.257	0.258	0.272	0.122	57.80	57.49	53.18	57.80
76.05	0.517	0.371	0.301	0.138	17.99	27.47	49.20	-17.99
Kontrola	0.40	0.363	0.323	0.04				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					43.49	42.37	65.24	42.93±0.79
P. major, Zlatar								
2.38	0.347	0.329	0.378	0.055	25.36	29.94	17.49	25.36
9.51	0.373	0.415	0.342	0.059	19.85	9.26	27.80	19.85
19.01	0.329	0.327	0.332	0.088	38.49	39.01	37.93	38.49
38.02	0.303	0.318	0.336	0.127	55.17	51.35	46.70	55.17
57.03	0.305	0.307	0.334	0.165	64.16	63.70	56.89	64.16
76.05	0.273	0.278	0.313	0.178	75.74	74.39	65.52	75.74
Kontrola	0.39	0.406	0.496	0.04				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					31.6	32.15	39.29	31.88±0.39



Grafik 8.42. Zavisnost I<sub>LP</sub> -  
radna koncentracija  
ekstrakata  
*P. major*, Kopaonik  
*P. major*, Novi Sad  
*P. major*, Zlatar

Tabela 8.50. Inhibicija lipidne peroksidacije  
(*P. maritima*, Padej; *P. media*, Kopaonik; *P. media*, Zlatar)

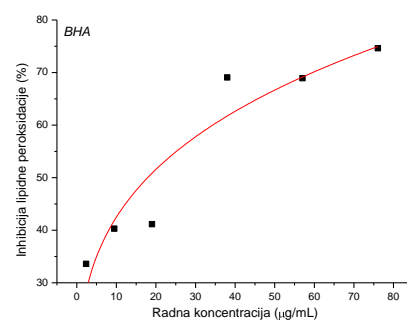
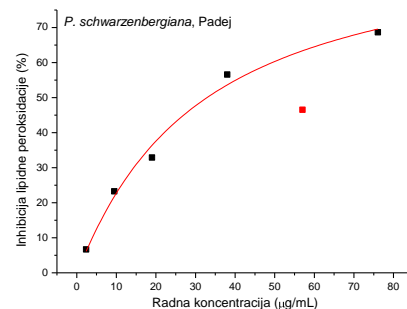
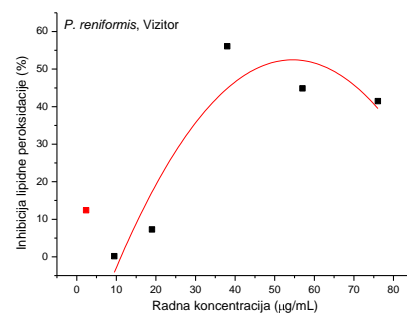
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				Inhibicija lipidne peroksidacije (%)			Srednja vrednost inhibicije
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	I-1	I-2	I-3	
<i>P. maritima</i> , Padej								
2.38	0.175	0.170	0.168	0.063	15.53	19.42	20.87	18.61
9.51	0.212	0.184	0.183	0.064	-11.8	9.10	10.47	9.78
19.01	0.218	0.211	0.213	0.115	22.03	27.39	25.95	25.13
38.02	0.245	0.244	0.228	0.167	41.33	41.71	53.94	45.66
57.03	0.258	0.277	0.297	0.215	67.40	53.19	37.91	52.83
76.05	0.297	0.276	0.307	0.245	60.39	75.88	52.82	63.03
Kontrola	0.174	0.178	0.164	0.04				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					47.21	46.68	46.19	46.69±0.51
<i>P. media</i> , Kopaonik								
2.38	0.273	0.240	0.225	0.057	0.33	15.63	22.31	12.76
9.51	0.256	0.228	0.218	0.068	12.91	25.78	30.75	23.14
19.01	0.222	0.270	0.233	0.142	62.84	40.67	57.81	53.77
38.02	0.283	0.314	0.285	0.180	52.37	38.04	51.63	47.35
57.03	0.313	0.347	0.349	0.216	54.92	39.33	38.29	44.18
76.05	0.330	0.341	0.331	0.282	77.71	72.97	77.48	76.06
Kontrola	0.249	0.272	0.249	0.04				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					23.03	32.49	31.41	31.95±0.76
<i>P. media</i> , Zlatar								
2.38	0.228	0.231	0.191	0.053	15.41	13.98	33.31	20.90
9.51	0.261	0.219	0.215	0.058	1.95	21.96	24.05	15.99
19.01	0.261	0.272	0.234	0.100	22.65	16.89	35.39	24.98
38.02	0.255	0.254	0.242	0.147	47.92	48.24	54.14	50.10
57.03	0.271	0.285	0.265	0.185	58.54	51.90	61.59	57.34
76.05	0.286	0.327	0.315	0.237	76.33	56.90	62.24	65.16
Kontrola	0.242	0.257	0.244	0.242				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					42.99	44.31	36.58	43.65±0.93



Grafik 8.42. Zavisnost I<sub>LP</sub> -  
radna koncentracija  
ekstrakata  
*P. maritima*, Padej  
*P. media*, Kopaonik  
*P. media*, Zlatar

Tabela 8.51. Inhibicija lipidne peroksidacije  
(*P. reniformis*, Vizitor; *P. schwarzenbergiana*, Padej; BHA)

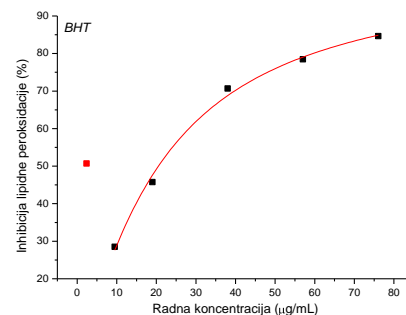
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				Inhibicija lipidne peroksidacije (%)			Srednja vrednost inhibicije
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	I-1	I-2	I-3	
<i>P. reniformis</i> , Vizitor								
2.38	0.250	0.265	0.242	0.049	13.46	6.88	16.83	12.39
9.51	0.280	0.289	0.282	0.052	1.63	-2.04	0.84	0.14
19.01	0.300	0.276	0.286	0.072	1.88	12.23	7.78	7.30
38.02	0.270	0.275	0.301	0.199	69.40	67.14	56.07	56.07
57.03	0.272	0.281	0.274	0.148	46.47	42.47	45.61	44.85
76.05	0.280	0.281	0.268	0.138	38.96	38.30	43.91	41.46
Kontrola	0.266	0.256	0.296	0.04				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					45.32	41.49	44.71	43.84±2.06
<i>P. schwarzenbergiana</i> , Padej								
2.38	0.196	0.194	0.191	0.052	4.91	6.53	8.56	6.67
9.51	0.170	0.190	0.184	0.065	30.68	17.73	21.33	23.25
19.01	0.211	0.223	0.187	0.105	30.39	22.26	45.98	32.88
38.02	0.226	0.239	0.230	0.166	60.39	51.57	57.72	56.56
57.03	0.242	0.279	0.267	0.182	60.53	35.71	43.42	46.55
76.05	0.251	0.277	0.286	0.224	81.86	64.87	59.18	68.64
Kontrola	0.210	0.193	0.171	0.04	81.86	64.87	59.18	68.64
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					32.78	35.23	34.07	34.03±1.23
BHA								
2.38	0.194	0.195	0.185	0.046	32.37	31.99	36.43	74.62
9.51	0.157	0.196	0.178	0.046	49.35	31.67	39.86	68.92
19.01	0.176	0.183	0.166	0.046	40.82	37.43	45.21	69.07
38.02	0.112	0.119	0.111	0.046	70.06	66.69	70.47	41.15
57.03	0.102	0.118	0.122	0.046	74.39	67.17	65.21	40.29
76.05	0.104	0.098	0.105	0.047	73.90	76.45	73.52	33.60
Kontrola	0.273	0.252	0.253	0.04				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					17.00	19.45	18.38	17.69±0.98



Grafik 8.43. Zavisnost I<sub>LP</sub> -  
radna koncentracija  
ekstrakata  
*P. reniformis*, Vizitor  
*P. schwarzenbergiana*, Padej  
BHA

Tabela 8.52. Inhibicija lipidne peroksidacije (BHT)

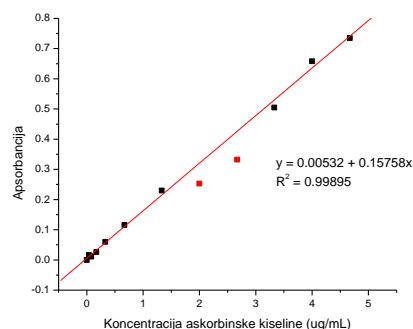
Radna konc. (µg/mL)	Apsorbancija				Inhibicija lipidne peroksidacije (%)			
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
BHT								
2.38	0.147	0.173	0.150	0.047	55.00	43.35	53.74	50.70
9.51	0.193	0.219	0.200	0.046	34.44	22.60	31.11	28.52
19.01	0.253	0.175	0.250	0.054	10.59	45.73	11.99	45.76
38.02	0.121	0.121	0.107	0.049	67.54	67.54	73.80	70.68
57.03	0.100	0.102	0.101	0.053	78.88	77.89	78.59	78.45
76.05	0.096	0.097	0.084	0.058	82.89	82.59	88.47	84.65
Kontrola	0.268	0.238	0.284	0.04				
IC <sub>50</sub> (µg/mL)					21.06	21.75	21.07	21.29±0.40

Grafik 8.44. Zavisnost I<sub>LP</sub> - radna koncentracija BHT

### 8.2.6. Redukcioni potencijal (FRAP test)

Tabela 8.53. Kalibraciona kriva  
(redoks potencijal askorbinske kiseline)

Početna konc. ask. kiseline (µg/mL)	Radna konc. ask. kiseline (µg/mL)	Radna proba				
		A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	A
140	4.67	0.627	1.017	0.835	0.034	0.735
120	4.00	0.758	0.764	0.740	0.039	0.658
100	3.33	0.590	0.634	0.599	0.046	0.505
80	2.67	0.448	0.428	0.400	0.036	0.332
60	2.00	0.329	0.370	0.362	0.043	0.253
40	1.33	0.348	0.301	0.317	0.035	0.23
20	0.67	0.185	0.232	0.205	0.035	0.116
10	0.33	0.158	0.165	0.140	0.037	0.06
5	0.17	0.118	0.120	0.121	0.037	0.026
2.5	0.08	0.106	0.108	0.111	0.040	0.011
1.25	0.04	0.118	0.107	0.108	0.038	0.016
Slepa proba	0.00	0.092	0.094	0.093	0.036	0



Grafik 8.45. Kalibraciona kriva korišćena za određivanje redoks potencijala ispitivanih ekstrakata: funkcija zavisnosti apsorbancije od koncentracije askorbinske kiseline

Tabela 8.54. Redukcioni potencijal ispitanih ekstrakata

Određivanje redukcionog potencijala	Apsorbancije radne probe i korekcije						Ekv. konc. ask. kiseline (µg/mL)	µg ekv. ask. kiseline	mg suvog ekstrakta	mg ekv. ask. kiseline/g suvog ekstrakta
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	A <sub>sr</sub>	A				
<i>P. altissima</i> , Novi Sad	0.295	0.259	0.336	0.043	0.297	0.171	1.0543	0.3163	0.005	63.26
	0.505	0.387	0.551	0.042	0.481	0.357	2.2318	0.6695	0.01	66.95
	0.837	0.799	0.967	0.046	0.868	0.740	4.6600	1.3980	0.02	69.90
<i>P. argentea</i> , Rtanj	0.247	0.266	0.290	0.046	0.268	0.164	1.0089	0.3027	0.005	60.54
	-	0.412	0.422	0.045	0.417	0.315	1.9663	0.5899	0.01	58.99
	0.689	0.691	0.666	0.047	0.682	0.577	3.6309	1.0893	0.02	54.46
<i>P. bellardii</i> , Ulcinj	0.213	0.225	0.218	0.043	0.219	0.119	0.7217	0.2165	0.005	43.30
	0.394	0.378	0.389	0.047	0.387	0.283	1.7634	0.5290	0.01	52.90
	0.610	0.651	0.565	0.044	0.609	0.508	3.1887	0.9566	0.02	47.83
<i>P. coronopus</i> , Čanj	0.327	0.349	0.361	0.043	0.346	0.246	1.5288	0.4586	0.005	91.73
	0.618	0.580	0.540	0.043	0.579	0.479	3.0045	0.9014	0.01	90.14
	1.093	1.148	0.895	0.041	1.045	0.947	5.9755	1.7926	0.02	89.63
<i>P. coronopus</i> , Niš	0.310	0.389	0.319	0.045	0.339	0.237	1.4727	0.4418	0.005	88.36
	0.502	0.588	0.604	0.044	0.565	0.464	2.9097	0.8729	0.01	87.29
	1.012	0.948	1.081	0.044	1.014	0.912	5.7553	1.7266	0.02	86.33
<i>P. holosteum</i> , Dimitrovgrad	0.322	0.331	0.348	0.045	0.334	0.231	1.4335	0.4301	0.005	86.01
	-	0.577	0.612	0.043	0.595	0.494	3.1026	0.9308	0.01	93.08
	0.977	1.015	0.988	0.044	0.993	0.892	5.6296	1.6889	0.02	84.44
<i>P. holosteum</i> , Kopaonik	0.411	0.453	0.463	0.055	0.442	0.330	2.0595	0.6178	0.005	123.57
	0.803	0.704	0.650	0.047	0.719	0.615	3.8667	1.1600	0.01	116.00

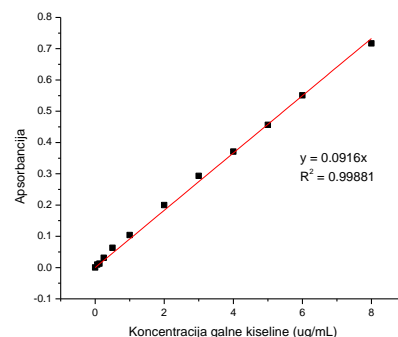


	1.387		1.104	0.044	1.245	1.144	7.2276	2.1683	0.02	108.41	
<i>P. lanceolata</i> , Bar	0.269	0.278	0.286	0.042	0.278	0.178	1.0987	0.3296	0.005	65.92	
	0.468	0.484	-	0.044	0.476	0.376	2.3499	0.7050	0.01	70.50	65.69±4.93
	0.717	0.717	0.792	0.042	0.742	0.643	4.0436	1.2131	0.02	60.65	
<i>P. lanceolata</i> , Fruška gora	-	0.431	0.390	0.043	0.411	0.311	1.9401	0.5820	0.005	116.41	
	0.582	0.626	0.747	0.047	0.652	0.548	3.4425	1.0327	0.01	103.27	109.80±6.57
	1.215	1.219	1.345	0.045	1.260	1.158	7.3156	2.1947	0.02	109.73	
<i>P. lanceolata</i> , Kopaonik	0.313	-	0.318	0.049	0.316	0.210	1.2983	0.3895	0.005	77.90	
	0.537	0.518	0.516	0.044	0.524	0.423	2.6505	0.7952	0.01	79.52	78.68±0.81
	0.947	0.935	0.930	0.049	0.937	0.831	5.2423	1.5727	0.02	78.63	
<i>P. lanceolata</i> , Zlatar	-	0.327	0.324	0.045	0.325	0.224	1.3859	0.4158	0.005	83.15	
	0.558	0.569	0.583	0.047	0.570	0.466	2.9247	0.8774	0.01	87.74	85.81±2.38
	0.988	1.056	1.007	0.045	1.017	0.915	5.7698	1.7309	0.02	86.55	
<i>P. major</i> , Fruška gora	0.334	0.281	0.324	0.043	0.313	0.213	1.3152	0.3946	0.005	78.91	
	0.569	0.468	0.389	0.042	0.476	0.376	2.3529	0.7059	0.01	70.59	73.89±4.42
	1.018	0.790	0.785	0.044	0.864	0.763	4.8110	1.4433	0.02	72.17	
<i>P. major</i> , Kopaonik	0.314	-	0.296	0.043	0.305	0.205	1.2659	0.3798	0.005	75.95	
	0.514	0.477	0.494	0.047	0.495	0.391	2.4467	0.7340	0.01	73.40	73.86±1.90
	0.870	0.877	0.852	0.045	0.866	0.764	4.8156	1.4447	0.02	72.23	
<i>P. major</i> , Novi Sad	0.221	0.229	0.220	0.043	0.223	0.123	0.7468	0.2240	0.005	44.81	
	0.386	0.306	0.384	0.048	0.358	0.254	1.5759	0.4728	0.01	47.28	47.26±0.02
	0.571	0.651	0.588	0.044	0.603	0.502	3.1500	0.9450	0.02	47.25	
<i>P. major</i> , Zlatar	0.236	0.249	0.247	0.047	0.244	0.140	0.8524	0.2557	0.005	51.15	
	0.416	0.438	0.411	0.045	0.422	0.320	1.9953	0.5986	0.01	59.86	57.86±2.83
	0.701	0.689	0.709	0.050	0.700	0.592	3.7238	1.1171	0.02	55.86	
<i>P. maritima</i> , Padej	0.335	-	0.360	0.045	0.348	0.246	1.5246	0.4574	0.005	91.48	
	0.604	0.597	-	0.042	0.600	0.501	3.1457	0.9437	0.01	94.37	93.39±1.66
	1.135	1.031	1.126	0.044	1.097	0.996	6.2883	1.8865	0.02	94.32	
<i>P. media</i> , Kopaonik	-	0.416	0.416	0.046	0.416	0.313	1.9547	0.5864	0.005	117.28	
	0.801	0.816	0.786	0.052	0.801	0.692	4.3592	1.3078	0.01	130.78	120.02±9.68
	1.285	1.338	1.229	0.045	1.284	1.182	7.4673	2.2402	0.02	112.01	
<i>P. media</i> , Zlatar	0.396	0.411	0.462	0.046	0.423	0.320	1.9988	0.5996	0.005	119.93	
	0.816	0.620	0.781	0.047	0.739	0.636	3.9999	1.2000	0.01	120.00	118.79±2.03
	-	1.272	1.388	0.044	1.330	1.229	7.7631	2.3289	0.02	116.45	
<i>P. reniformis</i> , Vizitor	0.226	0.208	0.225	0.042	0.220	0.121	0.7312	0.2194	0.005	43.87	
	0.334	0.334	0.339	0.042	0.335	0.237	1.4686	0.4406	0.01	44.06	44.48±0.90
	0.592	0.592	0.592	0.052	0.592	0.483	3.0345	0.9103	0.02	45.52	
<i>P. schwarzenbergiana</i> , Padej	0.289	0.307	0.248	0.051	0.281	0.173	1.0652	0.3196	0.005	63.91	
	0.402	0.432	0.459	0.043	0.431	0.331	2.0668	0.6201	0.01	62.01	61.68±2.42
	0.814	0.591	0.777	0.044	0.727	0.626	3.9410	1.1823	0.02	59.12	
slepa proba	0.093	0.092	0.096	0.037	0.094	0.057					

### 8.2.7. Sadržaj ukupnih fenola

Tabela 8.55. Kalibraciona kriva (ukupni fenoli)

Početna konc. galne kiseline (µg/mL)	Radna konc. galne kiseline (µg/mL)	Radna proba				
		A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	A
80	8.00	0.772	0.760	0.788	0.053	0.717
60	6.00	0.606	0.599	0.602	0.047	0.551
50	5.00	0.510	0.502	0.510	0.047	0.457
40	4.00	0.425	0.412	0.421	0.044	0.371
30	3.00	0.338	0.338	0.351	0.045	0.293
20	2.00	0.252	0.250	0.255	0.049	0.200
10	1.00	0.160	0.162	0.169	0.056	0.104
5	0.50	0.109	0.112	0.113	0.044	0.063
2.5	0.25	0.079	0.077	0.081	0.044	0.031
1.25	0.13	0.069	0.065	0.065	0.049	0.013
0.625	0.06	0.059	0.059	0.061	0.046	0.009
Slepa proba	0.00	0.054	0.053	0.055	0.049	0.00



Grafik 8.46.  
Kalibraciona kriva  
korišćena za određivanje  
sadržaja ukupnih fenola  
u ispitivanim  
ekstraktima: funkcija  
zavisnosti apsorbancije  
od koncentracije galne  
kiseline

Tabela 8.56. Sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim ekstraktima

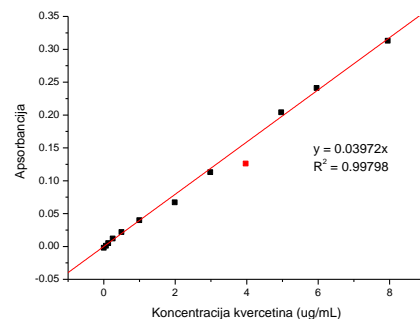
Određivanje sadržaja ukupnih fenola	Apsorbancije radne probe i korekcije						Ekv. konc. galne kiseline (µg/mL)	µg ekv. galne kiseline	mg suvog ekstrakta	mg ekv. galne kiseline/g suvog ekstrakta
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	A <sub>sr</sub>	A				
<i>P. altissima</i> , Novi Sad	0.182	0.171	0.186	0.051	0.180	0.099	1.0824	0.3247	0.0038	86.59
	0.287	0.260	0.264	0.052	0.270	0.189	2.0584	0.6175	0.0075	82.33
	0.459	0.417	0.465	0.054	0.447	0.363	3.9600	1.1880	0.0150	79.20
<i>P. argentea</i> , Rtanj	-	0.127	0.133	0.046	0.130	0.041	0.4475	0.1342	0.0038	35.80
	0.174	0.185	0.186	0.050	0.182	0.089	0.9702	0.2911	0.0075	38.81
	0.284	0.281	0.271	0.049	0.279	0.186	2.0341	0.6102	0.0150	40.68
<i>P. bellardii</i> , Ulcinj	0.121	-	0.133	0.045	0.127	0.039	0.4238	0.1271	0.0038	33.91
	0.179	0.180	0.175	0.049	0.178	0.086	0.9420	0.2826	0.0075	37.68
	0.278	0.270	0.253	0.051	0.267	0.173	1.8892	0.5667	0.0150	37.78
<i>P. coronopus</i> , Čanj	0.144	0.156	0.158	0.051	0.153	0.059	0.6400	0.1920	0.0038	51.20
	0.218	0.221	0.228	0.049	0.222	0.130	1.4209	0.4263	0.0075	56.84
	0.362	0.364	0.360	0.057	0.362	0.262	2.8598	0.8579	0.0150	57.20
<i>P. coronopus</i> , Niš	0.158	0.185	0.180	0.049	0.174	0.082	0.8955	0.2687	0.0038	71.64
	0.269	0.274	0.281	0.052	0.275	0.180	1.9650	0.5895	0.0075	78.60
	0.441	0.436	0.440	0.051	0.439	0.345	3.7651	1.1295	0.0150	75.30
<i>P. holostium</i> , Dimitrovgrad	0.161	0.175	0.173	0.052	0.170	0.075	0.8180	0.2454	0.0038	65.44
	0.241	0.245	0.197	0.050	0.228	0.134	1.4654	0.4396	0.0075	58.62
	0.369	0.362	0.381	0.051	0.371	0.277	3.0261	0.9078	0.0150	60.52

<i>P. holosteum</i> , Kopaonik	0.161	0.169	0.169	0.048	0.166	0.075	0.8164	0.2449	0.0038	65.31	68.76±3.08
	0.258	0.254	0.257	0.050	0.256	0.163	1.7814	0.5344	0.0075	71.26	
	0.416	0.417	0.408	0.052	0.414	0.319	3.4855	1.0456	0.0150	69.71	
<i>P. lanceolata</i> , Bar	0.137	0.132	0.126	0.045	0.132	0.044	0.4815	0.1445	0.0038	38.52	39.91±1.20
	0.176	0.182	0.180	0.044	0.179	0.093	1.0136	0.3041	0.0075	40.55	
	0.269	0.280	0.269	0.044	0.273	0.186	2.0327	0.6098	0.0150	40.65	
<i>P. lanceolata</i> , Fruška gora	0.189	-	-	0.047	0.189	0.099	1.0787	0.3236	0.0038	86.29	87.43±5.19
	0.280	0.274	0.295	0.050	0.283	0.190	2.0727	0.6218	0.0075	82.91	
	0.499	0.499	0.563	0.051	0.520	0.426	4.6549	1.3965	0.0150	93.10	
<i>P. lanceolata</i> , Kopaonik	0.153	0.192	0.140	0.047	0.162	0.072	0.7832	0.2350	0.0038	62.66	61.00±1.97
	0.206	0.278	0.201	0.044	0.228	0.141	1.5382	0.4615	0.0075	61.53	
	0.329	0.415	0.334	0.047	0.359	0.269	2.9407	0.8822	0.0150	58.81	
<i>P. lanceolata</i> , Zlatar	0.124	0.133	0.112	0.045	0.123	0.035	0.3823	0.1147	0.0038	-	48.50±1.79
	0.197	0.202	0.191	0.046	0.197	0.108	1.1807	0.3542	0.0075	47.23	
	0.320	0.312	0.318	0.046	0.317	0.228	2.4882	0.7465	0.0150	49.76	
<i>P. major</i> , Fruška gora	0.136	0.144	0.146	0.050	0.142	0.049	0.5338	0.1602	0.0038	42.71	42.62±1.04
	0.187	0.189	0.185	0.049	0.187	0.095	1.0385	0.3115	0.0075	41.54	
	0.305	0.289	0.292	0.052	0.295	0.200	2.1807	0.6542	0.0150	43.61	
<i>P. major</i> , Kopaonik	0.147	-	0.131	0.045	0.139	0.051	0.5606	0.1682	0.0038	44.85	45.30±2.33
	0.200	0.200	0.200	0.047	0.200	0.110	1.1954	0.3586	0.0075	47.82	
	0.264	0.338	0.261	0.047	0.288	0.198	2.1614	0.6484	0.0150	43.23	
<i>P. major</i> , Novi Sad	-	0.125	0.127	0.045	0.126	0.037	0.4061	0.1218	0.0038	32.49	34.95±2.13
	0.175	0.165	0.169	0.044	0.170	0.083	0.9056	0.2717	0.0075	36.22	
	0.257	0.252	0.253	0.046	0.254	0.166	1.8070	0.5421	0.0150	36.14	
<i>P. major</i> , Zlatar	0.146	0.147	0.154	0.048	0.149	0.057	0.6271	0.1881	0.0038	50.17	49.24±1.91
	0.205	0.215	0.215	0.053	0.212	0.116	1.2626	0.3788	0.0075	50.50	
	0.308	0.314	0.311	0.052	0.311	0.215	2.3523	0.7057	0.0150	47.05	
<i>P. maritima</i> , Padej	0.149	0.161	0.167	0.048	0.159	0.068	0.7416	0.2225	0.0038	59.33	63.32±3.57
	0.243	0.247	0.239	0.052	0.243	0.148	1.6117	0.4835	0.0075	64.47	
	0.406	0.400	0.383	0.050	0.396	0.303	3.3089	0.9927	0.0150	66.18	
<i>P. media</i> , Kopaonik	0.159	0.206	0.165	0.047	0.177	0.086	0.9417	0.2825	0.0038	75.34	70.97±3.85
	0.246	-	0.252	0.047	0.249	0.159	1.7380	0.5214	0.0075	69.52	
	0.413	0.409	0.393	0.050	0.405	0.312	3.4030	1.0209	0.0150	68.06	
<i>P. media</i> , Zlatar	0.174	0.174	0.174	0.045	0.174	0.086	0.9354	0.2806	0.0038	74.83	71.29±3.52
	0.257	0.247	0.248	0.044	0.250	0.163	1.7810	0.5343	0.0075	71.24	
	0.384	0.409	0.405	0.046	0.399	0.311	3.3898	1.0169	0.0150	67.80	
<i>P. reniformis</i> , Vizitor	0.172	0.149	0.144	0.053	0.155	0.059	0.6469	0.1941	0.0038	-	36.77±1.40
	0.181	0.177	0.174	0.052	0.177	0.082	0.8946	0.2684	0.0075	35.79	
	0.278	0.286	0.269	0.061	0.277	0.173	1.8880	0.5664	0.0150	37.76	
<i>P. schwarzenbergiana</i> , Padej	0.126	0.127	0.130	0.045	0.128	0.040	0.4347	0.1304	0.0038	34.78	36.16±1.95
	0.182	0.181	0.172	0.050	0.179	0.086	0.9383	0.2815	0.0075	37.53	
	0.301	0.296	0.299	0.051	0.299	0.205	2.2399	0.6720	0.0150	-	
slepa proba	0.084	0.088	0.086	0.043	0.043						

### 8.2.8. Sadržaj flavonoida

Tabela 8.57. Kalibraciona kriva (ukupni flavonoidi)

Početna konc. kvercetina (µg/mL)	Radna konc. kvercetina (µg/mL)	Radna proba				
		A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	A
80	7.947	0.517	0.483	0.424	0.162	0.313
60	5.960	0.409	0.397	0.337	0.140	0.241
50	4.967	0.353	0.339	0.284	0.122	0.204
40	3.974	0.279	0.281	0.230	0.137	0.126
30	2.980	0.205	0.206	0.175	0.083	0.113
20	1.987	0.147	0.148	0.127	0.074	0.067
10	0.993	0.093	0.094	0.103	0.057	0.040
5	0.497	0.073	0.071	0.071	0.049	0.022
2.5	0.248	0.065	0.058	0.055	0.048	0.012
1.25	0.124	0.051	0.048	0.048	0.044	0.005
0.625	0.062	0.046	0.045	0.044	0.044	0.001
Slepa proba	0.00	0.041	0.040	0.040	0.042	0.00



Grafik 8.47.  
Kalibraciona kriva korišćena za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u ispitivanim ekstraktima: funkcija zavisnosti apsorbancije od koncentracije kvercetina

Tabela 8.58. Sadržaj ukupnih flavonoida u ispitivanim ekstraktima

Određivanje sadržaja flavonoida	Apsorbancije radne probe i korekcije						Ekv. konc. kvercetina (µg/mL)	µg ekv. kvercetina	mg suvog ekstrakta	mg ekv. kvercetina/g suvog ekstrakta
	A-1	A-2	A-3	A <sub>kor</sub>	A <sub>sr</sub>	A				
<i>P. altissima</i> , Novi Sad	0.149	0.131	0.119	0.096	0.133	0.037	0.9406	0.2822	0.03	-
	0.169	0.179	0.170	0.111	0.173	0.062	1.5639	0.4692	0.06	7.82
	0.266	0.270	0.274	0.150	0.270	0.120	3.0308	0.9092	0.12	7.58
<i>P. argentea</i> , Rtanj	0.128	0.102	0.101	0.084	0.110	0.026	0.6522	0.1957	0.03	6.52
	0.178	0.147	0.150	0.095	0.148	0.054	1.3487	0.4046	0.06	6.74
	0.253	0.270	0.261	0.149	0.261	0.112	2.8196	0.8459	0.12	7.05
<i>P. bellardii</i> , Ulcinj	0.141	0.149	0.144	0.069	0.144	0.075	1.8880	0.5664	0.03	18.88
	0.208	0.217	0.216	0.080	0.214	0.133	3.3567	1.0070	0.06	16.78
	0.479	0.412	0.414	0.121	0.435	0.314	7.9128	2.3738	0.12	19.78
<i>P. coronopus</i> , Čanj	0.097	0.095	0.103	0.060	0.096	0.036	0.9079	0.2724	0.03	-
	0.133	0.138	0.139	0.084	0.137	0.053	1.3233	0.3970	0.06	6.62
	0.227	0.219	0.225	0.111	0.224	0.113	2.8449	0.8535	0.12	7.11
<i>P. coronopus</i> , Niš	0.102	0.111	0.119	0.082	0.111	0.029	0.7351	0.2205	0.03	7.35
	0.205	0.207	0.206	0.147	0.206	0.059	1.4819	0.4446	0.06	7.41
	0.273	0.282	0.279	0.164	0.278	0.114	2.8590	0.8577	0.12	7.15
<i>P. holosteam</i> , Dimitrovgrad	0.099	0.090	0.105	0.058	0.102	0.044	1.1135	0.3341	0.03	11.14
	0.206	0.151	0.169	0.079	0.160	0.081	2.0347	0.6104	0.06	10.17
	0.233	0.245	0.276	0.104	0.252	0.148	3.7249	1.1175	0.12	9.31
<i>P. holosteam</i> , Kopaonik	0.122	0.119	0.126	0.071	0.122	0.051	1.2941	0.3882	0.03	12.94
	0.176	0.181	0.191	0.083	0.182	0.100	2.5053	0.7516	0.06	12.53

	0.358	0.349	0.339	0.129	0.349	0.220	5.5375	1.6613	0.12	13.84	
<i>P. lanceolata</i> , Bar	0.082	0.084	0.081	0.061	0.082	0.021	0.5383	0.1615	0.03	5.38	
	0.108	0.102	0.114	0.070	0.114	0.044	1.1132	0.3340	0.06	5.57	5.32±0.29
	0.161	0.160	0.173	0.081	0.161	0.080	2.0026	0.6008	0.12	5.01	
<i>P. lanceolata</i> , Fruška gora	0.103	0.111	0.113	0.093	0.112	0.019	0.4744	0.1423	0.03	4.74	
	0.157	0.167	0.174	0.134	0.171	0.037	0.9266	0.2780	0.06	4.63	5.01±0.56
	0.261	0.274	0.274	0.180	0.269	0.090	2.2621	0.6786	0.12	5.66	
<i>P. lanceolata</i> , Kopaonik	0.082	0.081	0.078	0.064	0.082	0.017	0.4287	0.1286	0.03	4.29	
	0.132	0.120	0.121	0.088	0.124	0.037	0.9243	0.2773	0.06	4.62	4.90±0.79
	0.212	0.207	0.194	0.102	0.194	0.092	2.3155	0.6947	0.12	5.79	
<i>P. lanceolata</i> , Zlatar	0.081	0.084	0.086	0.063	0.083	0.020	0.5067	0.1520	0.03	5.07	
	0.111	0.121	0.117	0.076	0.116	0.041	1.0233	0.3070	0.06	5.12	5.24±0.26
	0.193	0.185	0.186	0.100	0.188	0.088	2.2168	0.6650	0.12	5.54	
<i>P. major</i> , Fruška gora	0.087	0.095	0.092	0.064	0.089	0.025	0.6235	0.1870	0.03	6.23	
	0.121	0.123	0.125	0.085	0.123	0.038	0.9624	0.2887	0.06	4.81	5.31±0.80
	0.190	0.202	0.201	0.120	0.198	0.077	1.9488	0.5846	0.12	4.87	
<i>P. major</i> , Kopaonik	0.071	0.076	0.072	0.054	0.073	0.019	0.4850	0.1455	0.03	4.85	
	0.107	0.097	0.094	0.062	0.099	0.037	0.9338	0.2801	0.06	4.67	4.48±0.49
	0.136	0.126	0.132	0.069	0.131	0.062	1.5720	0.4716	0.12	3.93	
<i>P. major</i> , Novi Sad	0.146	0.071	0.073	0.055	0.072	0.017	0.4301	0.1290	0.03	4.30	
	0.115	0.113	0.107	0.072	0.111	0.039	0.9941	0.2982	0.06	4.97	4.99±0.70
	0.184	0.199	0.180	0.092	0.182	0.090	2.2771	0.6831	0.12	5.69	
<i>P. major</i> , Zlatar	0.061	0.079	0.087	0.059	0.076	0.016	0.4085	0.1225	0.03	4.08	
	0.100	0.097	0.096	0.061	0.097	0.037	0.9225	0.2767	0.06	4.61	4.78±0.80
	0.167	0.159	0.168	0.075	0.165	0.090	2.2595	0.6779	0.12	5.65	
<i>P. maritima</i> , Padej	0.126	0.133	0.126	0.079	0.128	0.049	1.2359	0.3708	0.03	12.36	
	0.194	0.201	0.200	0.101	0.198	0.097	2.4517	0.7355	0.06	12.26	12.93±1.08
	0.372	0.362	0.374	0.145	0.370	0.225	5.6682	1.7005	0.12	14.17	
<i>P. media</i> , Kopaonik	0.098	0.104	0.100	0.070	0.101	0.031	0.7818	0.2345	0.03	7.82	
	0.146	0.144	0.143	0.074	0.145	0.071	1.7895	0.5369	0.06	8.95	8.30±0.58
	0.227	0.226	0.246	0.104	0.233	0.129	3.2490	0.9747	0.12	8.12	
<i>P. media</i> , Zlatar	0.083	0.087	0.090	0.056	0.087	0.031	0.7736	0.2321	0.03	7.74	
	0.151	0.161	0.168	0.076	0.151	0.074	1.8665	0.5600	0.06	9.33	8.69±0.84
	0.233	0.255	0.244	0.101	0.244	0.143	3.5974	1.0792	0.12	8.99	
<i>P. reniformis</i> , Vizitor	0.082	0.084	0.088	0.069	0.085	0.016	0.3935	0.1181	0.03	3.94	
	0.112	0.113	0.117	0.077	0.114	0.037	0.9248	0.2774	0.06	4.62	4.59±0.64
	0.181	0.185	0.180	0.099	0.182	0.083	2.0876	0.6263	0.12	5.22	
<i>P. schwarzenbergiana</i> , Padej	0.063	0.067	0.067	0.056	0.067	0.011	0.2741	0.0822	0.03	2.74	
	0.099	0.090	0.096	0.060	0.095	0.035	0.8766	0.2630	0.06	4.38	4.08±0.42
	0.140	0.131	0.132	0.074	0.132	0.057	1.4422	0.4326	0.12	3.61	
slepa proba	0.040	0.040	0.040	0.040	0.040	0.00					

### 8.3. Antiinflamatorni potencijal

Tabela 8.59. Inhibicija COX-1 (*P. altissima*, Novi Sad)

<i>P. altissima</i> , Novi Sad		12-HHT/PGB <sub>2</sub>				Inhibicija COX-1 (%)			
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (mg/mL)	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
10.0	0.4	0.00	0.720	0.681	0.667	12.17	16.94	18.60	15.90±2.76
25.0	1.0	0.00	0.531	0.593	0.581	35.19	27.73	29.18	30.70±4.30
50.0	2.0	0.00	0.521	0.486	0.476	36.42	40.78	41.97	39.72±2.52
100.0	4.0	0.00	0.505	0.447	0.438	38.40	45.49	46.58	43.49±4.09
150.0	6.0	0.00	0.259	0.385	0.377	68.43	53.09	54.03	61.23±10.18
200.0	8.0	0.00	0.286	0.357	0.350	65.16	56.41	57.29	59.62±5.05
Kontrola		0.00	0.925	0.891	0.644				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)						4.11	4.76	4.40	4.42±0.33

Tabela 8.60. Inhibicija 12-LOX (*P. altissima*, Novi Sad)

<i>P. altissima</i> , Novi Sad		12-HETE/PGB <sub>2</sub>				Inhibicija 12-LOX (%)			
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (mg/mL)	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
10.0	0.4	0.00	4.417	4.611	4.472	9.48	5.50	8.33	7.77±2.30
25.0	1.0	0.00	3.759	4.059	3.937	22.96	16.80	19.30	19.69±3.56
50.0	2.0	0.00	3.365	2.815	2.730	31.03	42.31	44.04	39.13±6.51
100.0	4.0	0.00	2.377	2.507	2.432	51.28	48.61	50.15	50.02±1.54
150.0	6.0	0.00	1.805	2.227	2.160	63.01	54.36	55.73	57.70±4.99
200.0	8.0	0.00	1.971	1.758	1.705	59.59	63.97	65.05	62.87±2.52
Kontrola		0.00	6.231	5.739	2.668				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)						3.94	3.42	3.42	3.59±0.30

Tabela 8.61. Inhibicija COX-1 (*P. argentea*, Rtanj)

<i>P. argentea</i> , Rtanj		12-HHT/PGB <sub>2</sub>				Inhibicija COX-1 (%)			
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (mg/mL)	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
10.0	0.4	0.943	1.055	1.019	0.943	6.28	-4.88	-1.31	6.28
25.0	1.0	0.760	0.721	0.655	0.760	24.49	28.33	34.84	29.22±5.23
50.0	2.0	0.572	0.430	0.528	0.572	43.11	57.27	47.49	49.29±7.25
100.0	4.0	0.376	0.367	0.356	0.376	62.61	63.47	64.57	63.55±0.98
150.0	6.0	0.202	0.222	0.211	0.202	79.94	77.91	79.05	78.97±1.02
200.0	8.0	0.118	0.129	0.168	0.118	88.31	87.16	83.29	86.25±2.63
Kontrola		0.935	1.029	1.053	0.935				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)						2.59	1.99	2.15	2.24±0.31

Tabela 8.62. Inhibicija 12-LOX (*P. argentea*, Rtanj)

<i>P. argentea</i> , Rtanj		12-HETE/PGB <sub>2</sub>				Inhibicija 12-LOX (%)			
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (mg/mL)	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
10.0	0.4	0.268	5.057	4.982	5.625	39.01	39.97	31.78	36.92±4.48
25.0	1.0	0.260	3.788	2.226	2.201	55.06	74.96	75.28	68.43±11.58
50.0	2.0	0.132	1.843	1.816	1.872	78.21	78.56	77.85	78.20±0.36
100.0	4.0	0.177	1.205	1.633	1.416	86.92	81.47	84.23	84.20±2.72
150.0	6.0	0.091	0.725	0.935	1.000	91.93	89.26	88.43	89.87±1.83
200.0	8.0	0.110	0.561	0.571	0.673	94.25	94.13	92.83	93.74±0.78
Kontrola		0.210	7.857	7.937	8.393				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)						0.61	0.51	0.57	0.56±0.05

Tabela 8.63. Inhibicija COX-1 (*P. coronopus*, Niš)

<i>P. coronopus</i> , Niš		12-HHT/PGB <sub>2</sub>				Inhibicija COX-1 (%)			
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (mg/mL)	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
10.0	0.4	0.00	1.305	0.900	0.892	-36.36	5.96	6.85	6.40±3.56
25.0	1.0	0.00	0.746	0.821	0.773	22.02	14.19	19.23	16.71±3.57
50.0	2.0	0.00	0.722	0.458	0.522	24.55	52.11	45.41	48.76±4.73
100.0	4.0	0.00	0.592	0.455	0.462	38.15	52.45	51.72	52.09±0.52
150.0	6.0	0.00	0.506	0.482	0.467	47.17	49.62	51.24	50.43±1.14
200.0	8.0	0.00	0.526	0.470	0.437	45.06	50.86	54.33	52.59±2.45
Kontrola		0.00	0.863	0.957	0.842				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)						-	1.83	2.73	2.28±0.64

Tabela 8.64. Inhibicija 12-LOX (*P. coronopus*, Niš)

<i>P. coronopus</i> , Niš		12-HETE/PGB <sub>2</sub>				Inhibicija 12-LOX (%)			
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (mg/mL)	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
10.0	0.4	0.00	7.177	5.901	5.986	1.72	19.20	18.04	18.62±0.82
25.0	1.0	0.00	3.242	4.748	3.454	55.61	34.99	52.71	47.77±11.16
50.0	2.0	0.00	4.986	2.817	3.010	31.72	61.43	58.79	50.64±16.44
100.0	4.0	0.00	3.158	2.354	2.915	56.76	67.76	60.09	61.54±5.64
150.0	6.0	0.00	2.366	2.736	2.639	67.60	62.54	63.87	64.67±2.63
200.0	8.0	0.00	2.423	2.202	1.881	66.83	69.85	74.25	70.31±3.73
Kontrola		0.00	6.925	7.844	7.140				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)						1.66	1.78	1.48	1.64±0.15

Tabela 8.65. Inhibicija COX-1 (*P. bellardii*, Ulcinj)

<i>P. bellardii</i> , Ulcinj		12-HHT/PGB <sub>2</sub>				Inhibicija COX-1 (%)			
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (mg/mL)	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
10.0	0.4	0.00	0.842	1.197	0.871	12.06	-25.11	9.00	10.53±2.16
25.0	1.0	0.00	0.829	1.070	0.882	13.39	-11.82	7.79	10.59±3.96
50.0	2.0	0.00	0.714	0.747	0.746	25.42	21.96	22.02	23.13±1.98
100.0	4.0	0.00	0.571	0.683	0.782	40.38	28.59	18.27	34.49±8.34
150.0	6.0	0.00	0.741	0.477	0.470	22.62	50.17	50.91	50.54±0.52
200.0	8.0	0.00	0.439	0.433	0.454	54.17	54.74	52.59	53.83±1.11
Kontrola		0.00	0.863	0.957	0.842				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)						6.36	6.82	6.59	6.59±0.23

Tabela 8.66. Inhibicija 12-LOX (*P. bellardii*, Ulcinj)

<i>P. bellardii</i> , Ulcinj		12-HETE/PGB <sub>2</sub>				Inhibicija 12-LOX (%)			
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (mg/mL)	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
10.0	0.4	0.00	6.886	8.351	6.769	5.71	-14.35	7.31	6.51±1.13
25.0	1.0	0.00	5.941	6.232	-	18.66	14.67	-	16.66±2.82
50.0	2.0	0.00	4.210	3.540	3.469	42.36	51.53	52.51	48.80±5.60
100.0	4.0	0.00	2.369	2.811	2.643	67.56	61.51	63.81	64.29±3.05
150.0	6.0	0.00	1.880	1.679	1.593	74.26	77.00	78.19	76.48±2.01
200.0	8.0	0.00	1.015	1.027	1.091	86.10	85.94	85.06	85.70±0.56
Kontrola		0.00	6.925	7.844	7.140				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)						2.58	2.34	2.10	2.34±0.24



Tabela 8.67. Inhibicija COX-1 (*P. holosteam*, Kopaonik)

<i>P. holosteam</i> , Kopaonik		12-HHT/PGB <sub>2</sub>				Inhibicija 12-LOX (%)			
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (mg/mL)	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
10.0	0.4	0.00	0.174	0.177	0.172	7.22	5.74	8.29	7.08±1.28
25.0	1.0	0.00	0.159	0.154	0.158	15.24	18.13	15.83	16.40±1.53
50.0	2.0	0.00	0.113	0.151	0.131	39.83	19.68	30.32	29.94±10.08
100.0	4.0	0.00	0.104	0.075	0.086	44.91	59.96	54.18	53.02±7.59
150.0	6.0	0.00	0.073	0.088	0.098	61.08	53.44	47.68	54.06±6.72
Kontrola		0.00	0.164	0.187	0.172	3.96	3.78	3.83	
IC <sub>50</sub> (mg/mL)						12.54	0.42	8.29	3.86±0.09

Tabela 8.68. Inhibicija 12-LOX (*P. holosteam*, Kopaonik)

<i>P. holosteam</i> , Kopaonik		12-HETE/PGB <sub>2</sub>				Inhibicija 12-LOX (%)			
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (mg/mL)	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
10.0	0.4	0.643	2.557	2.254	2.547	28.54	39.85	28.93	32.44±6.42
25.0	1.0	0.377	2.074	2.603	2.458	36.63	16.88	22.28	25.26±10.21
50.0	2.0	0.390	1.607	1.649	1.699	54.59	53.02	51.15	52.92±1.72
100.0	4.0	0.302	1.265	1.323	1.041	64.03	61.89	72.40	66.11±5.55
150.0	6.0	0.205	1.089	0.966	0.861	66.97	71.56	75.51	71.35±4.28
Kontrola		0.471	3.266	3.500	2.680				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)						2.05	2.33	2.15	2.18±0.14

Tabela 8.69. Inhibicija COX-1 (*P. lanceolata*, Fruška gora)

<i>P. lanceolata</i> , Fruška gora		12-HHT/PGB <sub>2</sub>				Inhibicija COX-1 (%)			
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (mg/mL)	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
10.0	0.4	0.00	1.147	1.231	1.256	11.60	5.14	3.19	6.65±4.40
25.0	1.0	0.00	1.173	1.052	1.229	9.63	18.97	5.28	11.29±6.99
50.0	2.0	0.00	0.950	0.577	0.532	45.82	55.51	59.00	53.44±6.83
100.0	4.0	0.00	0.473	0.506	0.535	63.58	61.01	58.77	61.12±2.41
150.0	6.0	0.00	0.447	0.572	0.556	65.54	68.92	57.19	63.88±6.03
200.0	8.0	0.00	0.318	0.346	0.303	75.52	73.37	76.63	75.17±1.66
Kontrola		0.00	1.085	0.966	1.298				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)						2.39	1.87	1.75	2.00±0.34

Tabela 8.70. Inhibicija 12-LOX (*P. lanceolata*, Fruška gora)

<i>P. lanceolata</i> , F. gora		12-HETE/PGB <sub>2</sub>				Inhibicija 12-LOX (%)			
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (mg/mL)	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
10.0	0.4	0.305	5.132	5.101	5.564	40.87	41.25	35.57	39.23±3.17
25.0	1.0	0.500	5.019	4.431	4.844	44.64	51.84	46.78	47.75±3.70
50.0	2.0	0.244	2.331	1.321	1.311	74.44	86.81	86.94	82.73±7.18
100.0	4.0	0.210	0.773	0.676	0.730	93.10	94.29	93.62	93.67±0.60
150.0	6.0	0.127	0.578	0.608	0.483	94.48	94.11	95.64	94.74±0.80
200.0	8.0	0.209	0.300	0.407	0.429	98.89	97.57	97.30	97.92±0.85
Kontrola		0.317	8.634	7.449	9.356				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)						0.81	0.65	0.78	0.75±0.08

Tabela 8.71. Inhibicija COX-1 (*P. major*, Fruška gora)

<i>P. major</i> , F. gora		12-HHT/PGB <sub>2</sub>				Inhibicija COX-1 (%)			
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (mg/mL)	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
10.0	0.4	0.00	0.658	0.585	0.571	42.40	48.80	50.00	47.06±4.09
25.0	1.0	0.00	0.594	0.524	0.596	48.02	54.07	47.79	49.96±3.56
50.0	2.0	0.00	0.477	0.449	0.329	58.27	60.63	71.23	63.38±6.90
100.0	4.0	0.00	0.419	0.265	0.301	63.29	76.83	73.64	71.25±7.08
150.0	6.0	0.00	0.209	0.210	0.199	81.66	81.65	82.58	81.96±0.53
200.0	8.0	0.00	0.167	0.147	0.170	85.40	87.12	85.07	85.87±1.10
Kontrola		0.00	1.131	1.049	1.246				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)						0.67	0.62	0.67	0.65±0.04

Tabela 8.72. Inhibicija 12-LOX (*P. major*, Fruška gora)

<i>P. major</i> , F. gora		12-HETE/PGB <sub>2</sub>				Inhibicija 12-LOX (%)			
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (mg/mL)	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
10.0	0.4	0.298	5.230	4.419	4.265	11.30	25.88	28.66	21.95±9.32
25.0	1.0	1.005	4.663	3.982	4.274	34.21	46.45	41.21	40.62±6.14
50.0	2.0	1.080	3.924	3.788	3.589	48.84	51.29	54.86	51.66±3.03
100.0	4.0	0.392	2.695	2.000	2.204	58.58	71.07	67.40	65.68±6.42
150.0	6.0	0.321	1.635	1.524	1.461	76.37	78.37	79.51	78.08±1.59
200.0	8.0	0.171	1.463	1.193	1.193	76.76	81.61	81.61	80.00±2.80
Kontrola		0.361	5.952	5.590	6.221				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)						1.93	1.67	1.58	1.73±0.18

Tabela 8.73. Inhibicija COX-1 (*P. maritima*, Padej)

<i>P. maritima</i> , Padej		12-HHT/PGB <sub>2</sub>				Inhibicija COX-1 (%)			
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (mg/mL)	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
10.0	0.4	0.00	1.165	1.031	1.007	-0.05	11.46	13.53	12.49±1.46
25.0	1.0	0.00	0.917	1.000	0.916	21.24	14.16	21.40	18.93±4.14
50.0	2.0	0.00	0.692	0.774	0.757	40.63	33.53	35.01	36.39±3.75
100.0	4.0	0.00	0.602	0.671	0.667	48.28	42.39	42.77	44.48±3.30
150.0	6.0	0.00	0.596	0.583	0.561	48.88	49.96	51.85	50.23±1.50
200.0	8.0	0.00	0.508	0.469	0.491	56.39	59.71	57.82	57.97±1.66
Kontrola		0.00	1.048	0.977	1.165				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)						4.93	5.12	5.38	5.14±0.23

Tabela 8.74. Inhibicija 12-LOX (*P. maritima*, Padej)

<i>P. maritima</i> , Padej		12-HETE/PGB <sub>2</sub>				Inhibicija 12-LOX (%)			
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (mg/mL)	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
10.0	0.4	0.540	7.004	6.737	6.344	11.63	15.27	20.65	15.85±4.54
25.0	1.0	0.489	4.506	5.314	5.240	45.08	34.04	35.05	38.06±6.10
50.0	2.0	0.213	3.880	3.700	3.765	49.86	52.32	51.43	51.20±1.24
100.0	4.0	0.336	3.401	3.947	4.051	58.10	50.63	49.22	52.65±4.78
150.0	6.0	0.299	3.409	3.736	3.558	57.48	53.01	55.44	55.31±2.23
200.0	8.0	0.250	3.398	3.429	3.420	56.96	56.54	56.66	56.72±0.22
Kontrola		0.377	7.994	7.388	7.691				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)						1.98	2.18	1.84	2.00±0.17

Tabela 8.75. Inhibicija COX-1 (*P. media*, Zlatar)

<i>P. media</i> , Zlatar		12-HHT/PGB <sub>2</sub>				Inhibicija COX-1 (%)			
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (mg/mL)	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
10.0	0.4	0.00	1.114	0.942	0.879	-6.18	10.21	16.25	13.23±4.27
25.0	1.0	0.00	1.000	0.946	0.874	4.71	9.88	16.71	10.44±6.02
50.0	2.0	0.00	0.917	0.819	0.753	12.62	21.94	28.21	20.92±7.85
100.0	4.0	0.00	0.412	0.477	0.493	60.74	54.52	53.06	56.11±4.07
150.0	6.0	0.00	0.000	0.304	0.382	100.0	71.07	63.65	78.24±19.21
200.0	8.0	0.00	0.289	0.273	0.282	72.42	73.96	73.16	73.18±0.77
Kontrola		0.00	1.298	1.037	0.814				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)						3.34	3.62	3.79	3.58±0.23

Tabela 8.76. Inhibicija 12-LOX (*P. media*, Zlatar)

<i>P. media</i> , Zlatar		12-HETE/PGB <sub>2</sub>				Inhibicija 12-LOX (%)			
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (mg/mL)	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
10.0	0.4	0.00	6.743	5.644	5.274	12.53	26.78	31.59	23.63±9.91
25.0	1.0	0.00	5.084	5.143	5.095	34.05	33.28	33.90	33.74±0.41
50.0	2.0	0.099	4.354	3.911	3.861	44.81	50.55	51.20	48.85±3.51
100.0	4.0	0.131	2.249	2.591	2.564	72.53	68.09	68.43	69.68±2.47
150.0	6.0	0.115	0.115	1.634	1.730	100.0	80.30	79.05	86.53±11.88
200.0	8.0	0.169	1.276	1.236	1.192	85.64	86.16	86.73	86.18±0.55
Kontrola		0.183	9.360	7.584	6.730				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)						1.94	1.97	1.88	1.93±0.05

Tabela 8.77. Inhibicija COX-1 (*P. reniformis*, Vizitor)

<i>P. reniformis</i> , Vizitor		12-HHT/PGB <sub>2</sub>				Inhibicija COX-1 (%)			
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (mg/mL)	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
10.0	0.4	0.00	1.157	1.125	1.154	7.12	9.70	7.34	8.06±1.43
25.0	1.0	0.00	1.033	1.108	1.007	17.13	11.04	19.15	15.77±4.22
50.0	2.0	0.00	0.958	0.822	0.908	23.10	34.02	27.11	28.08±5.53
100.0	4.0	0.00	0.713	0.765	0.789	42.78	38.60	36.69	40.69±2.96
150.0	6.0	0.00	0.589	0.547	0.563	52.70	56.08	54.83	54.54±1.71
200.0	8.0	0.00	0.509	0.724	0.558	59.17	41.86	55.18	52.07±9.07
Kontrola		0.00	1.131	1.049	1.246				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)						5.74	4.88	6.00	5.54±0.59

Tabela 8.78. Inhibicija 12-LOX (*P. reniformis*, Vizitor)

<i>P. reniformis</i> , Vizitor		12-HETE/PGB <sub>2</sub>				Inhibicija 12-LOX (%)			
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (mg/mL)	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
10.0	0.4	0.392	5.581	6.250	5.911	16.59	5.83	11.29	11.24±5.38
25.0	1.0	0.357	3.908	5.050	4.547	42.92	24.57	32.65	33.38±9.20
50.0	2.0	0.206	3.916	4.102	4.012	40.36	37.38	38.83	38.86±1.49
100.0	4.0	0.268	2.856	3.390	3.070	58.39	49.81	54.95	54.39±4.32
150.0	6.0	0.266	2.783	2.850	2.875	59.54	58.47	58.08	58.70±0.76
200.0	8.0	0.261	3.046	3.073	3.011	55.23	54.80	55.79	55.28±0.50
Kontrola		0.361	5.952	5.590	6.221				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)						2.99	3.62	3.15	3.25±0.33

Tabela 8.79. Inhibicija COX-1 (*P. schwarzenbergiana*, Padej)

<i>P.schwarzenbergiana</i> , Padej		12-HHT/PGB <sub>2</sub>				Inhibicija COX-1 (%)			
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (mg/mL)	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
10.0	0.4	1.026	1.139	1.126	1.026	2.28	-8.54	-7.32	2.28
25.0	1.0	1.318	0.989	1.010	1.318	-25.56	5.77	3.76	4.77±1.42
50.0	2.0	0.892	0.900	0.895	0.892	15.01	14.24	14.72	14.66±0.39
100.0	4.0	0.720	0.729	0.831	0.720	31.38	30.58	20.83	27.59±5.87
150.0	6.0	0.542	0.426	0.504	0.542	48.39	59.43	51.95	53.26±5.64
200.0	8.0	0.393	0.323	0.488	0.393	62.57	69.19	53.52	61.76±7.87
Kontrola		1.298	1.037	0.814	1.298				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)						6.26	5.59	5.57	5.81±0.39

Tabela 8.80. Inhibicija 12-LOX (*P. schwarzenbergiana*, Padej)

<i>P.schwarzenbergiana</i> , Padej		12-HETE/PGB <sub>2</sub>				Inhibicija 12-LOX (%)			
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (mg/mL)	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
10.0	0.4	0.00	4.224	7.257	6.808	45.21	5.86	11.68	8.77±4.11
25.0	1.0	0.00	6.529	6.439	7.253	15.30	16.47	5.91	12.56±5.79
50.0	2.0	0.00	5.658	5.115	5.125	26.60	33.65	33.52	31.26±4.03
100.0	4.0	0.00	4.138	4.162	4.085	46.33	46.01	47.01	46.45±0.51
150.0	6.0	0.619	2.962	2.594	2.903	69.61	74.38	70.38	71.46±2.56
200.0	8.0	0.449	1.989	1.774	1.997	80.02	82.80	79.92	80.91±1.64
Kontrola		0.183	9.360	7.584	6.730				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)						4.14	3.80	3.94	3.96±0.17

Tabela 8.81. Inhibicija COX-1 (aspirin)

Aspirin		12-HHT/PGB <sub>2</sub>				Inhibicija COX-1 (%)			
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (mg/mL)	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
0.01	0.0004	0.00	0.145	0.146	0.143	16.86	15.86	17.86	16.86±1.00
0.025	0.001	0.00	0.072	0.067	0.099	58.52	61.59	43.32	54.48±9.78
0.05	0.002	0.00	0.00	0.00	0.00	100.0	100.0	100.0	100.00±0.00
0.1	0.004	0.00	0.00	0.00	0.00	100.0	100.0	100.0	100.00±0.00
0.3	0.012	0.00	0.00	0.00	0.00	100.0	100.0	100.0	100.00±0.00
0.6	0.024	0.00	0.00	0.00	0.00	100.0	100.0	100.0	100.00±0.00
Kontrola		0.00	0.184	0.192	0.145				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)						9.9×10 <sup>-4</sup>	9.8×10 <sup>-4</sup>	1.01×10 <sup>-3</sup>	0.0010±0.0008

Tabela 8.82. Inhibicija COX-1 (bajkalein)

Bajkalein		12-HHT/PGB <sub>2</sub>				Inhibicija COX-1 (%)			
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (mg/mL)	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
0.05	0.002	0.00	0.801	0.728	0.714	18.39	25.82	27.30	23.84±4.77
0.156	0.006	0.00	-	-	-	-	-	-	-
0.312	0.0125	0.00	0.793	0.773	0.758	19.25	21.25	22.82	21.11±1.79
0.625	0.025	0.00	0.382	0.314	0.308	61.06	68.01	68.65	65.91±4.21
1.25	0.05	0.00	0.124	0.176	0.173	87.40	82.06	82.42	83.96±2.99
2.5	0.1	0.00	0.00	0.00	0.00	100.0	100.0	100.0	100.00±0.00
5.0	0.2	0.00	0.00	0.00	0.00	100.0	100.0	100.0	100.00±0.00
Kontrola		0.00	0.855	0.967	1.124				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)						0.018	0.020	0.0197	0.0192±0.0011

Tabela 8.83. Inhibicija 12-LOX (bajkalein)

Bajkalein		12-HETE/PGB <sub>2</sub>				Inhibicija 12-LOX (%)			
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (mg/mL)	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
0.05	0.002	0.00	3.734	3.697	3.617	44.62	45.17	46.34	45.37±0.88
0.156	0.006	0.00	2.015	1.859	1.822	70.12	72.43	72.98	71.85±1.52
0.312	0.0125	0.00	2.056	1.993	1.953	69.52	70.44	71.03	70.33±0.76
0.625	0.025	0.00	0.563	0.487	0.477	91.65	92.78	92.93	92.45±0.70
1.25	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	100.0	100.0	100.0	100.00±0.00
2.5	0.1	0.00	0.00	0.00	0.00	100.0	100.0	100.0	100.00±0.00
5	0.2	0.00	0.00	0.00	0.00	100.0	100.0	100.0	100.00±0.00
Kontrola		0.00	6.998	6.489	6.743				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)						0.0027	0.0025	0.0024	0.0025±0.00014

Tabela 8.83. Inhibicija 12-LOX (kvercetin)

Kvercetin		12-HETE/PGB <sub>2</sub>				Inhibicija 12-LOX (%)			
Početna konc. (mg/mL)	Radna konc. (mg/mL)	Korekcija	Proba-1	Proba-2	Proba-3	I-1	I-2	I-3	Srednja vrednost inhibicije
0.156	0.00624	0.00	1.135	1.332	1.189	12.31	-2.93	8.17	10.24±2.93
0.312	0.01248	0.00	1.362	0.929	1.068	-5.22	28.24	17.50	22.87±7.60
0.625	0.025	0.00	1.150	0.920	1.272	11.14	28.96	1.70	20.05±12.61
1.25	0.05	0.00	0.749	0.672	1.018	42.17	48.07	21.37	37.21±14.03
2.5	0.1	0.00	0.893	0.982	0.580	31.04	24.12	55.17	36.78±16.30
5	0.2	0.00	0.00	0.00	0.00	100.0	100.0	100.0	100.00±0.00
Kontrola		0.00	1.796	1.796	1.796				
IC <sub>50</sub> (mg/mL)						0.076	0.084	0.091	0.084±0.01

## 9. SKRAĆENICE

ABAP	2,2'-azobis-(2-amidopropan) dihidrohlorid
ABTS <sup>•+</sup>	2,2-azinobis-(3-etilbenzotiatolin-6-sulfonat) radikalski katjon
AMP	adenozin-monofosfat
ANS	autonomni nervni sistem
ARDS	adultni respiratorni distres sindrom
BHA	butilovani hidroksianizol (2- <i>terc</i> -butil-4-hidroksianizol i 3- <i>terc</i> -butil-4-hidroksianizol)
BHT	butilovani hidroksitoluen (2,6-di- <i>terc</i> -butil-4-metilfenol)
cAMP	ciklični adenzin-monofosfat
CID	kolizijom indukovana disocijacija ( <i>Collision Induced Dissociation</i> )
CNS	centralni nervni sistem
COX	ciklooksigenaza
DAG	diacilglicerol
DPPH <sup>•</sup>	1,1-difenil-2-pikrilhirdazil radikal
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina
EET	epoksieikosatrien-kiselina
EIA	enzimski imunoesej ( <i>Enzyme Immunoassay</i> )
FLAP	protein koji aktivira 5-lipooksigenazu ( <i>Five Lipoxygenase Activating Protein</i> )
FRAP	Antioksidantna moć redukcije Fe(III) jona ( <i>Ferric Ion Reducing Antioxidant Power</i> )
GC-FID	Gasna hromatografija sa plamenim jonizujućim detektorom ( <i>Gas Chromatography - Flame Ionization Detector</i> )
HETE	hidroeikosatetraen-kiselina
12-HETE	12( <i>S</i> )-hidroksi-(5 <i>Z</i> ,8 <i>Z</i> ,10 <i>E</i> ,14 <i>Z</i> )-eikosatetraen-kiselina
12-HHT	12( <i>S</i> )-hidroksi-(5 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> ,10 <i>E</i> )-heptadekatrien-kiselina
HPETE	hidroperoksieikosatetraen-kiselina
HPLC	tečna hromatografija visokih performansi ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
HPTLC	visoko efikasna hromatografija na tankom sloju ( <i>High Performance Thin Layer Chromatography</i> )
IL	interleukin
iNOS	inducibilni oblik NO sintaze
IP	inozitol fosfat
LC-MS/MS	tečna hromatografija sa tandemskim masenim detektorom ( <i>Liquid</i>



	<i>Chromatography/Tandem Mass Spectrometry)</i>
LDL	lipoproteini niske gustine ( <i>Low-Density Lipoproteins</i> )
LOX	lipooksigenaza
LT	leukotrien
LX	lipoksin
MDA	malonildialdehid
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MS2SIM	<i>selected ion monitoring, single-stage MS</i>
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
NADH	redukovani nikotinamid adenin dinukleotid
NBT	tetrazolijum nitro-plavo ( <i>nitro-blue tetrazolium</i> )
NEDA	<i>N</i> -(1-naftil)-etilendiamin dihidrohlorid
NK ćelije	prirodne ćelije ubice ( <i>Natural Killer Cells</i> )
NSAIL ( <i>NSAIDs</i> )	nesteroidni antiinflamatorni lekovi ( <i>Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs</i> )
ORAC	Test za određivanje kapaciteta absorpcije kiseoničnog radikala ( <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay</i> )
PAF	faktor agregacije trombocita ( <i>Platelet Activating Factor</i> )
PG	prostaglandin
PL	fosfolipaza
PLAP	proteini koji aktiviraju fosfolipazu ( <i>Phospholipase Activating Proteins</i> )
PMS	fenazin-metilsulfat
RBS	reaktivne vrste broma ( <i>Reactive Bromine Species</i> )
RCS	reaktivne vrste hlora ( <i>Reactive Chlorine Species</i> )
RIA	radio-imunoesej ( <i>Radioimmunoassay</i> )
RNS	reaktivne vrste azota ( <i>Reactive Nitrogen Species</i> )
ROS	reaktivne vrste kiseonika ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
RSC	kapacitet „hvatanja“ slobodnih radikala ( <i>radical scavenging capacity</i> )
SA	sulfanilamid
SNP	natrijum-nitroprusid ( <i>sodium nitroprusside</i> )
TBA	tiobarbiturna kiselina
TCA	trihlorsirćetna kiselina ( <i>trichloroacetic acid</i> )
TEAC	antioksidantni kapacitet izražen u ekvivalentima trolox-a ( <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i> )
TLC	tankoslojna hromatografija ( <i>Thin Layer Chromatography</i> )
TNF- $\alpha$	$\alpha$ -faktora nekroze tumora ( <i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i> )
TPTZ	2,4,5-tripiridil-s-triazin

TRAP	Test za određivanje ukupne antioksidantne sposobnosti „hvatanja“ radikala ( <i>Total Radical-Traping Antioxidant Parameter Assay</i> )
TX	tromboksen

**UNIVERZITET U NOVOM SADU**  
**PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET**  
**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

**Redni broj:**

RBR

**Identifikacioni broj:**

IBR

**Tip dokumentacije:**

Monografska dokumentacija

TD

**Tip zapisa:**

Tekstualni štampani materijal

TZ

**Vrsta rada:**

Doktorska disertacija

VR

**Autor:**

Ivana N. Beara

AU

**Mentor:**

Dr Neda Mimica-Dukić, red. prof. PMF-a u Novom Sadu

MN

**Naslov rada:**Fitohemijski skrining i procena antioksidantnog i antiinflamatornog potencijala sekundarnih biomolekula u vrstama roda *Plantago* L.

NR

**Jezik publikacije:**

Srpski (latinica)

JP

**Jezik izvoda:**

Srpski/engleski

JI

**Zemlja publikovanja:**

Republika Srbija

ZP

**Uže geog. područje:**

Vojvodina

UGP

**Godina:**

2010.

GO

**Izdavač:**

Autorski reprint

IZ

**Mesto i adresa:**

Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3

MA

**Fizički opis rada:**

Broj poglavlja: 9. Strana: 255. Lit. citata: 274. Tabela: 111. Grafika: 47. Slika: 90. Histograma: 16.

FO

**Naučna oblast:**

Biohemija

NO

**Naučna disciplina:**

Biohemija lekovitog bilja

ND

**Predmetna odrednica/** *Plantago* L., antioksidantna aktivnost, antiinflamatorna  
**Ključne reči:** aktivnost, LC-MS/MS, ciklooksigenaza-1, 12-lipooksigenaza

PO  
UDK  
**Čuva se:** Biblioteka Departmana za hemiju, PMF, Trg D. Obradovića 3, Novi Sad

ČU  
**Važna napomena:** —  
VN  
**Izvod:** Karakterizacija metanolnih ekstrakata jedanaest vrsta samoniklih bokvica (rod *Plantago* L.) obuhvatala je fitohemijski skrining i ispitivanje antioksidantne i antiinflamatorne aktivnosti. Primenom LC-MS/MS tehnike određen je sadržaj odabranih sekundarnih biomolekula. Antioksidantna aktivnosti ekstrakata (sposobnost neutralizacije slobodnih radikala, redukcionog potencijala i inhibicija lipidne peroksidacije) ispitana je primenom spektrofotometrijskih metoda. U cilju određivanja antiinflamatornog potencijala, razvijena je *in vitro* metoda za praćenje aktivnosti trombocitne ciklooksigenaze-1 i 12-lipooksigenaze. Svi ispitani ekstrakti pokazali su značajnu biološku aktivnost.

IZ  
**Datum prihvatanja teme od strane NN veća:** 26.02.2009.  
DP  
**Datum odbrane:**  
DO  
**Članovi komisije:**  
(Naučni stepen/ime i prezime/zvanje/fakultet)  
KO

**Predsednik:** dr Ksenija Kuhajda, red. prof. PMF-a u Novom Sadu

**Član:** dr Mira Popović, red. prof. PMF-a u Novom Sadu  
**Član:** dr Ružica Igić, red. prof. PMF-a u Novom Sadu  
**Član:** dr Momir Mikov, red. prof. Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF SCIENCES  
KEY WORDS DOCUMENTATION**

**Accession number:**

ANO

**Identification number:**

INO

**Document type:**

Monography document

DT

**Type of record:**

Printed text

TR

**Contents code:**

PhD Thesis

CC

**Author:**

Ivana Beara

AU

**Mentor:**Professor Neda Mimica-Dukić, Faculty of  
Sciences, Novi Sad

MN

**Title:**Phytochemical screening and evaluation of  
antioxidant and anti-inflammatory potential of  
secondary metabolites of *Plantago* L. species

TI

**Language of text:**

Serbian (Latin)

LT

**Language of abstract:**

Serbian/English

LA

**Country of publication:**

Serbia and Montenegro

CP

**Locality of publication:**

Vojvodina

LP

**Publication year:**

2010.

PY

**Publisher:**

Author's reprint

PU

**Publishing place:**

Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3

PP

**Physical description:**Chapters: 9. Pages: 255. References: 274.  
Tables: 111. Figures: 47. Pictures: 90. Charts: 16.

PD

**Scientific field:**

Biochemistry

SF

**Scientific discipline:**

Biochemistry of medicinal plants

SD

**Subject/Key words:**

*Plantago* L., antioxidant activity, anti-inflammatory activity, LC-MS/MS analysis, cyclooxygenase-1, 12-lipoxygenase

SKW

UC

**Holding data:**

Department of Chemistry (Library), Faculty of Sciences, Trg D. Obradovića 3, Novi Sad

HD

**Note:**

—

N

**Abstract:**

Characterization of methanol extracts of eleven *Plantago* L. species included phytochemical screening and evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity. The content of several secondary metabolites was determined by LC-MS/MS technique. Antioxidant activity of extracts (radical scavenger capacity, reduction potential and inhibition of lipid peroxidation) was examined by spectrophotometric methods. With the intention to evaluate anti-inflammatory activity, an *in vitro method* was developed to measure activity of platelet cyclooxygenase-1 and 12-lipoxygenase. All examined extracts showed noticeable biological activity.

AB

**Accepted by****the Scientific Board on:**

26.02.2009.

ASB

**Defended:**

DE

**Thesis defend board:****(Degree/name/surname/title/faculty)**

DB

President:

Dr Ksenija Kuhajda, Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad

Member:

Dr Mira Popović, Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad

Member:

Dr Ružica Igić, Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad

Member:

Dr Momir Mikov, Professor, Faculty of Medicine, Novi Sad



Ivana Beara je rođena 20.05.1976. godine u Novom Sadu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu (grupa Hemija, obrazovni profil Diplomirani hemičar) upisala je 1995. godine, a diplomirala 1999. god. Učestvovala je na jednom internacionalnom studentskom naučnom skupu.

Magistarske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu, grupa Hemija, upisala je 1999. god., gde se iste godine zaposlila kao istraživač-pripravnik, a 2003. god. je izabrana u zvanje asistenta-pripravnika za užu naučnu oblast Organska hemija. Magistarsku tezu pod nazivom "Novi pristup enantiodivergentnoj sintezi odabranih citotoksičnih laktona i analoga" odbranila je u julu 2004. godine. U januaru 2007. god. izabrana je u zvanje asistenta za užu naučnu oblast Biohemija.

Bila je angažovana na katedri za Organsku hemiju, a od 2003. godine na Katedri za biohemiju i hemiju prirodnih proizvoda Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine PMF-a u Novom Sadu. Od oktobra 2004. godine do maja 2006. godine bila je na trudničkom-porodiljskom odsustvu.

Koautor je sedam naučnih radova koji su objavljeni u međunarodnim časopisima (pet M21, jedan M22 i jedan M23 kategorije), šesnaest naučnih saopštenja prezentovanih na internacionalnom i jedanaest saopštenja prezentovanih na domaćem naučnom skupu.

Član je društva Society of Medicinal Plant Research (GA) i Srpskog hemijskog društva.

*Ivana Beara*

Novi Sad, april 2010. god.